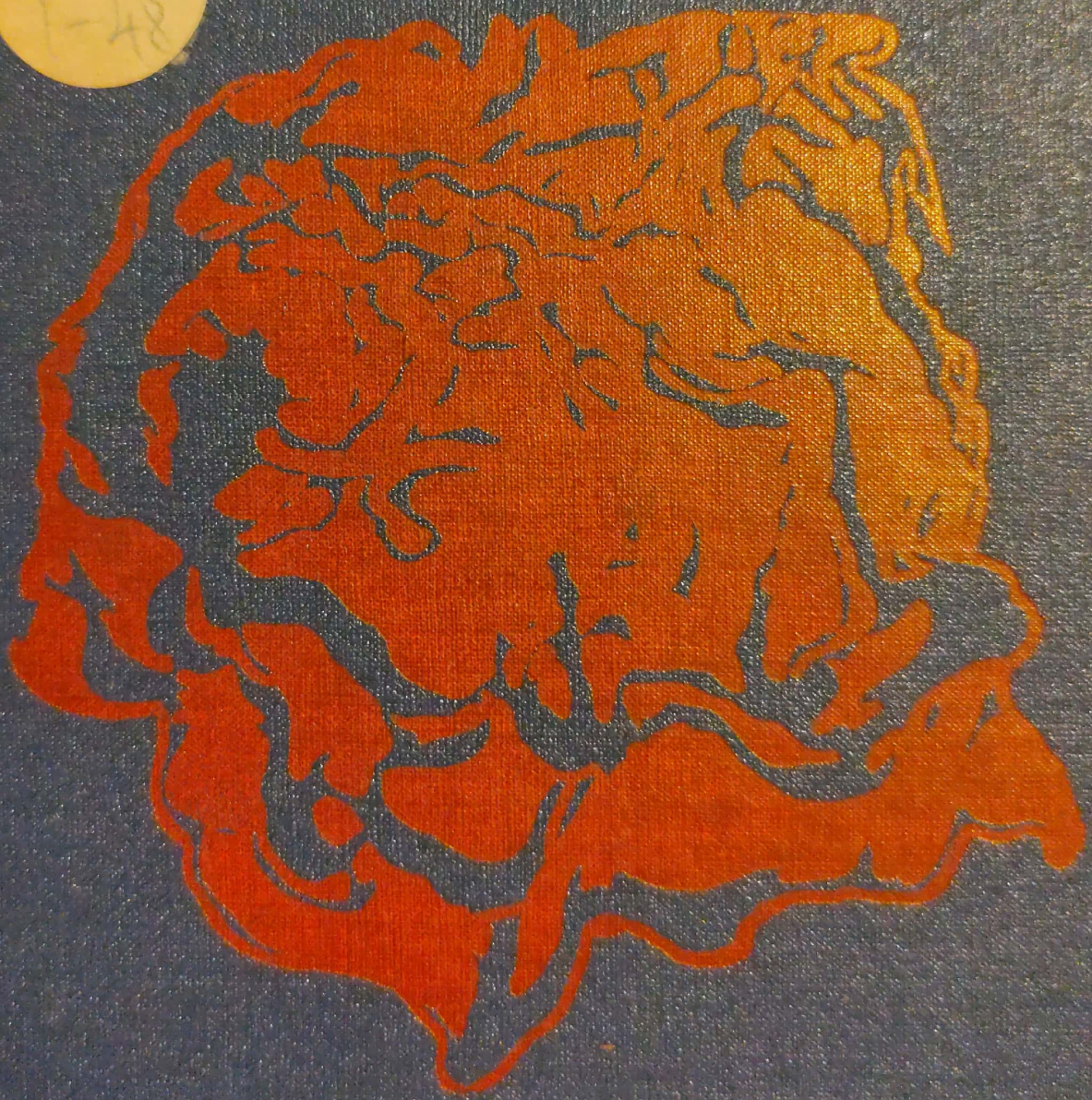
Imunitatea și imunoprofilaxia la animale

619
F-48



Scanned with OKEN Scanner

Redactor:
Dr. med. vet. Despina Tudor
*
Tehnoredactor:
Virgil Andreica
*
Coperta și supracoperta:
Eugen Stoian
*
Grafice în text:
Anghel Moldoveanu

Scanned with OKEN Scanner

619
J-48

C. VIOR
H. RĂDUCĂNESCU
N. MANOLESCU
A. POPOVICIU

Imunitatea și imunoprofilaxia la animale

Scanned with OKEN Scanner

Cuvînt înainte

Imunologia contemporană constituie unul dintre cele mai elocvente exemple ale dezvoltării impetuoase a științei. Granițele cunoștințelor în acest domeniu au depășit cu mult limitele stabilite cu relativ puțin timp în urmă. Fiecare an aduce noi și noi date; mecanismele proceselor imunologice sînt aprofundate în tot mai mare măsură și, ca urmare, ne aflăm în prezent în fața unui tablou unitar și coerent al acestui complex sistem de apărare care este ansamblul efectorilor celulari și umorali ai imunității.

Este indiscutabil că și cunoștințele actuale sînt perfectibile, că ele vor fi depășite prin eforturile și realizările numeroaselor colective de imunologi din întreaga lume. Cu toate acestea, în stadiul actual al dezvoltării sale, imunologia a constituit un edificiu cu numeroase componente de o mare utilitate practică directă pentru sănătatea omului și a animalelor.

Lucrarea care este prezentată în volumul de față reprezintă o încercare de sinteză a principiilor moderne ale imunologiei, cele care stau la baza tuturor metodelor de imunodiagnostic și imunoprofilaxie.

Cunoașterea proceselor fundamentale ale apărării de natură imunologică reprezintă o condiție esențială a înțelegerii și a interpretării situației reale în evoluția bolilor în care componentele imunologice sînt în mod hotărîtor implicate. Numai dintr-o astfel de privire asupra fenomenelor patologice poate să rezulte aplicarea unor metode corecte și eficiente de diagnostic, prevenire, terapie și combatere prin mijloace specifice.

Pentru realizarea acestei lucrări se cuvine să exprimăm gratitudinea noastră Institutului de Cercetări veterinare și Biopreparate „Pasteur" și Facultății de medicină veterinară din București; în același timp, datorăm mulțumirile noastre tuturor colegilor medici, medici veterinari, chimiști sau biologi care, și în țara noastră, au contribuit la dezvoltarea imunologiei.

Editura Ceres a adus un aport hotărîtor la realizarea acestei lucrări; conducerii sale, colegilor Dr. Despina Tudor și Dr. I. Petrescu le exprimăm mulțu-

Scanned with OKEN Scanner

mirile și aprecierile noastre pentru înalta competență și pasiunea pe care le depun în slujba promovării și răspîndirii în cele mai adecvate forme, a cunoștințelor științifice.

Ne exprimăm speranța că medicii veterinari din țara noastră, cei cărora li se adresează în primul rînd lucrarea de față, vor găsi în capitolele sale o argumentație utilă a muncii lor, precum și un ansamblu de cunoștințe strîns legate de lupta pentru apărarea sănătății animalelor.

Autorii

Scanned with OKEN Scanner

Cuprins

I. OBIECTUL IMUNOLOGIEI (H. Răducănescu) 11
II. IMUNITATEA NATURALĂ ŞI DOBÎNDITĂ (H. Răducănescu) 15
II. 1. Imunitatea naturală 15
II. 2. Imunitatea dobîndită (inductibilă) 22
III. ANTIGENUL (C. Vior) 24
III.1. Definiţie 24
III.2. Factori determinanţi 24
III.3. Haptenele 30
III.4. Condiţii de imunogenitate şi antigenitate 30
III.5. Categorii de antigene 31
III.6. Metode de preparare şi studiu al antigenelor 39
IV. RĂSPUNSUL IMUN (IMUNOGENEZA) 41
IV.1. Sistemul celular al imunităţii (S.C.I.) (N. Manolescu, H. Răducănescu) 42
IV.1.1. Organele imunocompetente primare (centrale) 42
IV.1.2. Organele imunocompetente secundare (periferice) 44
IV.2. Celule imunologic competente (N. Manolescu, H. Răducănescu) 45
IV.2.1. Transformarea blastică *„in vitro"* a limfocitelor (N. Manolescu) 50
IV.2.2. Detalii ultrastructurale ale celulelor imunocompetente evidenţiate prin microscopie electronică (N. Manolescu) 53
IV.3. Morfologia sistemului celular al imunităţii în reacţiile imune şi hiperimune (N. Manolescu) 55
IV.3.1. Morfologia S.C.I. în reacţiile imune 55
IV.3.2. Morfologia S.C.I. în reacţiile hiperimune 58
IV.4. Dinamica răspunsului imun (H. Răducănescu) 61
IV.5. Răspunsul imun primar şi secundar (H. Răducănescu) 75
IV.6. Particularităţi ale răspunsului imun în cancer (H. Răducănescu) 77
V. EFECTORI UMORALI AI IMUNITĂŢII (ANTICORPII) (C. Vior) 79
V.1. Compoziţia şi structura imunoglobulinelor 79
V.1.1. Compoziţia chimică 79
V.1.2. Nomenclatura imunoglobulinelor 82
V.1.3. Proprietăţile imunoglobulinelor 82

Scanned with OKEN Scanner

V.1.4. Regiuni şi fragmente de imunoglobuline 82
V.1.5. Structura lanţurilor imunoglobulinice 84
V.1.6. Structuri spaţiale 86
V.2. Dezvoltarea filogenetică a imunoglobulinelor 87
V.3. Izotipie, alotipie şi idiotipie 88
V.4. Clasele de imunoglobuline 89
V.5. Aspecte particulare ale funcţiilor imunoglobulinelor la animale 95
V.5.1. Răspunsul imunologic la fetus şi la animale nou-născute 95
V.5.2. Transferul imunoglobulinelor prin colostru şi lapte 99
V.5.3. Imunitatea pasivă la animalele nou-născute 100
V.5.4. Imunoglobulinele la animalele domestice 104
VI. EFECTORII CELULARI AI IMUNITĂŢII (H. Răducănescu) 110
VII. COMPLEMENTUL (ALEXINA) ŞI PROPERDINA (H. Răducănescu) 115
VII.1. Complementul 115
VII.2. Properdina 121
VIII. POTENŢAREA ŞI DIMINUAREA RĂSPUNSULUI IMUN, TOLERANŢA IMUNOLOGICĂ (H. Răducănescu) 122
VIII.1. Potenţarea răspunsului imun 122
VIII.2. Diminuarea sau suprimarea răspunsului imun 123
VIII.3. Toleranţa imunologică 125
IX. ELEMENTE DE IMUNOGENETICĂ (H. Răducănescu) 127
IX.1. Baza genetică a răspunsului imun 127
IX.2. Determinanţii genetici ai imunoglobulinelor 129
IX.3. Baza genetică a unor procese imunopatologice 132
X. TEORII ŞI IPOTEZE ASUPRA UNOR ASPECTE NEDEMONSTRATE EXPERIMENTAL ALE RĂSPUNSULUI IMUN (H. Răducănescu) 134
X.1. Teorii generale privind modul în care atigenul determină elaborarea efectorilor imuni specifici 134
X.2. Ipoteze şi încercări de explicare a unor particularităţi caracteristice fenomenelor imunologice 136
X.3. Încercări de explicare a memoriei imunologice 139
XI. FENOMENELE DE HIPERSENSIBILIZARE (C. Vior) 140
XI.1. Definiţii. Clasificări 140
XI.2. Hipersensibilizarea de tip imediat 141
XI.2.1. Anafilaxia 141
XI.2.2. Fenomenul de citoliză alergică 147
XI.2.3. Fenomenul de tip Arthus 148
XI.3. Hipersensibilizarea de tip tardiv 149
XI.3.1. Fenomene de hipersensibilizare în infecţii 151
XI.3.2. Alte manifestări ale fenomenului de hipersensibilizare de tip întîrziat 154
XI.4. Hipersensibilizarea de tip Sanarelli-Schwartzman 155
XI.5. Celule şi imunoglobuline implicate în fenomenele de hipersensibilizare. Substanţe alergenice 156
XII. REACŢII ANTIGEN-ANTICORP METODE APLICATE ÎN IMUNODIAGNOSTIC (C. Vior, H. Răducănescu) 159
XII.1. Generalităţi 159
XII.2. Metode de testare a capacităţii de răspuns imun la nivel celular 161
XII.2.1. Testul de hemoliză localizată în gel 162
XII.2.2. Teste de formare a rozetelor de globule roşii 163
XII.2.3. Testul de imunostimulare a limfocitelor 164

Scanned with OKEN Scanner

XII.2.4. Transformarea blastică a limfocitelor (metoda directă) 166
XII.2.5. Inhibarea migrării celulelor (testul inhibării migrării macrofagelor) 167
XII.2.6. Examene citologice directe (N. Manolescu) 168
XII.2.7. Testul de agregare a leucocitelor 169
XII.2.8. Autoradiografia 170
XII.3. Metode de evidenţiere a reacţiilor antigen-anticorp 173
XII.3.1. Teste de imunodifuziune şi precipitare 173
XII.3.2. Reacţiile de neutralizare 181
XII.3.3. Neutralizarea bacteriofagilor 186
XII.3.4. Reacţia de inhibare a hemaglutinării 187
XII.3.5. Testul de hemaglutinare pasivă (indirectă) 190
XII.3.6. Testul de imunohemoliză pasivă 193
XII.3.7. Testul de inhibare a sinciţiilor 195
XII.3.8. Inhibarea dezvoltării în culturi prin anticorpi 195
XII.3.9. Testul COFAL 197
XII.3.10. Testul de imunofluorescenţă 198
XII.3.11. Testul imunoenzimatic 201
XII.3.12. Testul imunoperoxidazei 206
XII.3.13. Testul cu radioalergosorbenţi 207
XII.3.14. Testul imunoferitinei 208
XII.3.15. Testul de imunomicroscopie electronică 210
XIII. IMUNOPROFILAXIA (A. Popoviciu) 211
XIII.1. Evoluţie şi cadru 211
XIII.2. Principii de imunoprofilaxie cu seruri imune şi gammaglobuline 212
XIII.2.1. Imunizarea pasivă 212
XIII.2.2. Principii de imunoprofilaxie prin gammaglobuline 217
XIII.3. Imunoprofilaxia prin vaccinuri 221
XIII.3.1. Vaccinuri constituite din germeni vii şi virulenţi 222
XIII.3.2. Vaccinuri din germeni atenuaţi 224
XIII.3.3. Vaccinuri din microorganisme inactivate 226
XIII.3.4. Vaccinuri din toxine detoxifiate (anatoxine) 228
XIII.3.5. Substanţe adjuvante şi imunostimulente nespecifice 229
XIII.3.6. Prepararea şi controlul vaccinurilor 230
XIII.3.7. Aplicarea vaccinurilor 235
XIII.3.8. Eficienţa măsurilor de imunoprofilaxie şi planificarea lor 239
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ 241

Scanned with OKEN Scanner

I Obiectul imunologiei

La începuturile ei, imunologia a fost considerată ca o ştiinţă care se ocupă cu studiul mecanismelor de rezistenţă antiinfecţioasă, acestea constituind în ansamblul lor starea de imunitate (de la cuvîntul latin *immunis* = scutit, în sensul de nereceptiv). În urma descoperirii implicaţiilor fenomenelor imunologice într-un număr mare de procese care depăşesc domeniul mecanismelor defensive antiinfecţioase ale organismului, s-a schimbat în bună măsură şi optica asupra conţinutului acestei discipline.

Obiectul de studiu al imunologiei este privit astăzi în raport cu comportarea organismului faţă de structurile „self" şi „non self". Aceşti doi termeni au fost împrumutaţi din literatura engleză şi adoptaţi prin convenţie de imunologii din întreaga lume, avînd semnificaţia de *self* = propriu şi *non self* = străin. Organismul are capacitatea de a recunoaşte şi de a deosebi selful de non self, reacţionînd în mod diferit faţă de aceste două tipuri de structuri, după cum urmează: selful este recunoscut şi acceptat, iar non selful este respins, printr-o gamă variată de mecanisme (îndepărtare, distrugere, neutralizare), sub acţiunea unor structuri şi funcţii definite prin termenul generic de „efectori imuni".

În sfera de studiu a imunologiei au fost cuprinse toate modalităţile de comportare a organismului faţă de structurile non self. Pe baza constatării că, pe de o parte, în anumite condiţii sub acţiunea a diferiţi factori nocivi structurile self se pot modifica dobîndind proprietăţi de non self, iar pe de altă parte nu toate reacţiile organismului faţă de non self se finalizează prin efecte favorabile pentru organism, unele determinînd adevărate stări patologice, diferitele tipuri de răspuns ale organismului faţă de non self au fost repartizate în sfera de studiu a două discipline apropiate, dar distincte.

În cadrul imunologiei a rămas studiul tuturor fenomenelor imunologice care au drept consecinţă rezistenţa faţă de non self sau faţă de eventualele lui efecte nocive, în timp ce fenomenele imunologice care determină stări patologice au fost grupate în cadrul unei discipline de graniţă — imunopatologia — situată între imunologie şi patologie.

Stările şi reacţiile organismului bazate pe mecanisme imunologice sau imunopatologice sînt individualizate şi clasificate pe baza a patru criterii:

— capacitatea organismului de a recunoaşte şi a distinge selful de non self:

— specificitatea sau lipsa specificităţii reacţiei faţă de non self;

— efectul pentru organism (favora-

bil sau nefavorabil) al reacţiei faţă de non self;

— categoria efectorilor imuni — umorali sau celulari.

Pe baza acestor criterii, diferitele stări şi reacţii ale organismului pot fi încadrate în domeniul imunologiei şi respectiv al imunopatologiei.

În domeniul imunologiei sînt încadrate:

1. imunitatea naturală caracterizată prin capacitatea organismului de a recunoaşte şi de a reacţiona nespecific şi nediferenţiat faţă de non self prin efectori imuni constituiţi din structuri şi funcţii normale;

2. imunitatea dobîndită sau inductibilă, caracterizată prin capacitatea organismului de a recunoaşte şi de a reacţiona prin efectori imuni constituiţi din structuri şi funcţii de neoformaţie, specific şi diferenţiat adaptate particularităţilor fizico-chimice ale fiecărui non self în parte.

Structurile sau compuşii chimici non self capabili să determine efectori imuni specifici poartă numele de antigene, iar procesul de elaborare al acestora este numit răspuns imun sau imunogeneză.

În domeniul imunopatologiei sînt încadrate:

1. alergia sau hipersensibilitatea, asemănătoare ca determinism cu imunitatea dobîndită, dar cu consecinţe diferite pentru organism; acesta recunoaşte non selful, elaborează efectori imuni specifici, dar prezenţa lor duce la o stare de sensibilizare şi nu de rezistenţă faţă de antigen.

În cazul unei viitoare pătrunderi în organism a aceluiaşi antigen, cuplarea lui cu efectorii imuni specifici nu protejează organismul, ci dimpotrivă, provoacă o reacţie alergică, avînd toate caracterele unei stări patologice;

2. stările de deficit imunologic caracterizate prin recunoaşterea non selfului, dar incapacitatea producerii efectorilor imuni datorită subdezvoltării bazei morfofiziologice responsabile de elaborarea acestora;

3. imunosupresia, caracterizată prin nerecunoaşterea şi lipsa de răspuns imun faţă de antigene, în general datorită distrugerii aparatului imunoformator sau anihilării capacităţii acestuia de a elabora efectori imuni;

4. toleranţa imunologică, reprezentînd incapacitatea de răspuns imun circumscrisă la un singur antigen, organismul răspunzînd normal faţă de restul antigenelor;

5. rejecţia grefelor este o reacţie de îndepărtare a non selfului după recunoaşterea acestuia, realizată prin acţiunea efectorilor imuni preponderent celulari;

6. fenomenele de autoagresiune caracteristice bolilor autoimune, determinate de nerecunoaşterea selfului datorită modificării lui sub acţiunea unor factori patogeni care-i alterează proprietăţile fizico-chimice, transformîndu-l de fapt în non self. Organismul produce efectori imuni faţă de propriile lui ţesuturi şi organe, care acţionează în continuare grăbind degradarea acestora.

Studiul aprofundat al mecanismelor fenomenelor imunologice a determinat nu numai conturarea imunopatologiei ca nouă disciplină de graniţă, dar a generat încă două discipline, care au servit în ultimii ani imunologia cu întreaga lor zestre tehnică şi metodologică, înlesnindu-i extraordinarul progres înregistrat în ultimele decenii. Acestea sînt:

imunochimia, al cărui obiect îl constituie studiul compoziţiei chimice al antigenelor şi al efectorilor imuni, al reacţiilor chimice care guvernează răspunsul imun şi toate tipurile de interreacţie între antigene şi efectorii imuni în întreaga lor diversitate;

imunogenetica, care studiază mecanismele genetice ale răspunsului imun, determinanţii genetici responsabili pentru toate detaliile structurale şi procesele de variaţie ale efectorilor imuni.

Scanned with OKEN Scanner

Impactul actual al imunologiei se extinde asupra unui mare număr de ramuri și procese din multiple domenii ale științelor biologice. Probleme mai importante ale medicinei și medicinei veterinare în care găsirea unor explicații depind în mare parte de domeniul imunologiei sînt următoarele: eradicarea unor boli, tolerarea grefelor, combaterea sterilității, elucidarea etiopatogeniei și îmbunătățirea imunoterapiei în boala canceroasă și altele.

Scanned with OKEN Scanner

II Imunitatea naturală şi dobîndită

II. 1. Imunitatea naturală

Imunitatea naturală este starea de rezistenţă faţă de diferiţi factori nocivi „non self" de natură infecţioasă realizată de organism prin structurile şi funcţiile lui normale. Ea poate fi considerată identică cu stările descrise în literatură de-a lungul timpului sub termenii de rezistenţă nespecifică (naturală, înnăscută, ereditară, constitutivă).

În problema amplasării imunităţii naturale şi a studiului mecanismelor ei în cadrul imunologiei se constată absenţa unui punct de vedere unitar. Unele tratate şi manuale mai recente (Byung şi col., 1974; Fougereau, 1975) nu o mai includ în cadrul imunologiei, pornind probabil de la optica după care domeniul acestei discipline trebuie să se limiteze numai la studiul răspunsului imun specific şi diferenţiat faţă de non selful reprezentat de o structură sau substanţă cu proprietăţi antigenice. După unele păreri emise de imunologi clasici ca Bordet, Topley, Zilber etc., la care aderă Mesrobeanu şi Păunescu (1975), imunitatea naturală trebuie privită ca un fenomen distinct de rezistenţă înnăscută, cele două stări deosebindu-se pe baza mecanismelor prin care ele se realizează. Conform acestui punct de vedere, imunitatea naturală implică, prin analogie cu cea dobîndită, efectori umorali şi celulari, în timp ce rezistenţa înnăscută are la bază factori genetici constituţionali. Unii autori menţionează separat „imunitatea genetică", ca stare de rezistenţă bazată în primul rînd pe structura genetică a speciei, liniei sau individului.

În contextul acestei neuniformităţi de vederi asupra locului, definirii exacte şi a categoriilor de mecanisme ale imunităţii naturale, poziţia care ni se pare cea mai judicioasă este următoarea:

1. imunitatea naturală trebuie să-şi păstreze locul în cadrul imunologiei pe baza următoarelor patru argumente principale:

a) reprezintă o formă de răspuns faţă de „non self";

b) este în cea mai mare parte mediată prin factori similari cu cei ai imunităţii dobîndite (umorali şi celulari);

c) unii din aceşti factori au un rol ambivalent sub aspectul participării lor atît la mecanismele imunităţii naturale, cît şi ale celei dobîndite, cum este cazul fagocitozei şi pinocitozei;

d) în menţinerea stării de sănătate imunitatea naturală şi cea dobîn-

dită nu acționează separat, ci cooperant și interdependent, asigurînd „supravegherea imunologică" a organismului;

2. departajarea imunității naturale de o stare de rezistență înnăscută sau naturală nu se justifică, chiar dacă în determinismul imunității naturale intervin structuri și funcții care nu-și au un echilibru în mecanismele imunității dobîndite (barierele, particularitățile constituționale, factorii genetici etc.).

Principalele caracteristici ale imunității naturale sînt următoarele:

— sfera ei de cuprindere se referă la toți indivizii unei specii biologice (are un caracter de specie);

— treapta filogenetică pe care apare este reprezentată de viețuitoarele cu cea mai simplă structură, inclusiv protozoarele, organismele vegetale unicelulare și bacteriile;

— momentul apariției ei este strîns legat de istoria formării speciei, fiind deci o însușire constituită în cursul evoluției filogenetice a acesteia;

— este un caracter genetic stabil transmisibil ereditar;

— efectorii imunității naturale sînt constituiți din structuri și funcții normale ale organismului;

— acțiunea acestor efectori este nespecifică și nediferențiată, exercitîndu-se la fel, indiferent de natura non selfului;

— în determinismul acestei stări nu sînt implicate mecanisme de memorie.

Factorii imunității naturale la organismele superioare se pot clasifica după mai multe criterii: a) localizarea lor în organism, după care pot fi împărțiți în interni și externi; b) felul în care participă la determinismul stării de imunitate, unii fiind factori predominant pasivi, iar alții activi; c) nivelul lor de organizare biologică sau biochimică: unii sînt compuși chimici, în marea lor majoritate prezenți în umori (factori umorali), dar și intracelular, iar alții diferite celule răspîndite în aproape toate organele și țesuturile care acționează prin însăși activitatea lor biologică (factori celulari); d) complexitatea structurii sau funcției constituente a factorului de rezistență, deosebindu-se unii factori cu un grad redus de complexitate (factorii menționați anterior), alții fiind complecși, reprezentați de caracteristici constituționale, constante morfologice sau fiziologice ale organismului cum sînt structura genetică, presiunea sanguină, temperatura normală etc.; e) natura factorului în raport cu normalul și patologicul: majoritatea factorilor imunității naturale sînt caracteristici stării de sănătate; unele procese care concurează la îndepărtarea sau distrugerea non selfului sînt însă de domeniul patologicului (hipertermia, inflamația, producția de interferon). Aceștia din urmă acționează după ce non selful a reușit să se instaleze în organism și pot avea două tipuri de consecințe posibile pentru organism: unul salutar, în cazul cînd non selful este făcut inofensiv, altul nociv cînd menținerea non selfului duce la o amplificare a procesului patologic, agravînd evoluția bolii.

Luînd în considerare criteriile de clasificare amintite, factorii și mecanismele imunității naturale pot fi sistematizate conform schemei de la pag. 17.

Întrucît studiul majorității acestor factori ține de domeniul patrimoniului clasic al imunologiei, urmează a fi dezvoltate în continuare numai două probleme în a căror elucidare există contribuții de dată mai recentă. Acestea sînt: caracterul ambivalent al fagocitozei și pinocitozei ca mecanisme mixte ale imunității naturale și dobîndite (inductibile) și producția de interferon ca tip de reacție celulară cu spectru larg față de non self.

1. *Fagocitoza și pinocitoza* sînt mecanisme cunoscute în cele mai fine detalii. Termenul de fagocitoză este utilizat pentru particule cu o talie mai mare și o structură de regulă corpusculară (o celulă bacteriană sau animală sau un fragment din acestea), iar cel

Scanned with OKEN Scanner

- **Barierele naturale**
  - externe
    - pielea
    - mucoasele
    - capcanele anatomice (cornetii nazali)
  - interne
    - pereții vaselor
    - țesuturile dense
    - membranele celulare
- **Mecanisme de potențare a rolului barierelor**
  - regenerarea și exfolierea epiteliilor
  - mișcările cililor epiteliilor ciliate
  - acțiunea secrețiilor glandelor
    - mecanică
      - spălare
      - includere în mucus urmată de eliminare
    - chimică
      - acidul undecilenic (piele)
      - acidul clorhidric (sucul gastric)
      - factori umorali diverși prezenți în lacrimi, lapte etc.
  - antagonismul microbian între flora normală autohtonă și cea patogenă autohtonă sau alohtonă (flotantă)
- **Factori umorali**
  - lizozimul
  - complementul
  - sistemul properdinic
  - polipeptidele bazice
  - beta-lizina
  - opsonina
  - anticorpi naturali diverși
- **Factori celulari**
  - microfagele
    - leucocitele polimorfonucleare în general și mai ales cele neutrofile
  - macrofagele
    - mobile
      - histiocitul
      - monocitul
    - fixe
      - celulele Kuppfer
      - macrofagele
      - osteoclastele
      - celulele nevroglice
        - splenice
        - peritoneale
        - alveolare
        - din ganglionii limfatici
        - din endoteliile vasculare
- **Mecanisme complexe**
  - fiziologice
    - temperatura normală
    - circulația sanguină și limfatică
    - presiunea sanguină
  - fiziopatologice
    - hipertermia
    - inflamația
    - elaborarea de interferon
- **Factori constituționali și genetici cu caracter de**
  - specie
  - rasă
  - linie
  - individ

BIBLIOTECA JUDEȚEANĂ „GH. ASACHI" IAȘI

399.904

Scanned with OKEN Scanner

de pinocitoză pentru materialele fagocitabile, al căror nivel de organizare este molecular (macromolecule proteice sau complexe, endotoxine bacteriene etc.). Ambele fenomene au aceeași dinamică, ele desfășurîndu-se în 3 faze:

— faza de fixare a materialului fagocitabil pe fagocit, realizată pe fondul chimiotactismului determinat de complementaritățile de natură electrostatică și stereochimică dintre receptorii membranei fagocitului și grupările chimice de la periferia particulei fagocitabile; faza de fixare este mediată și de intervenția unor factori umorali din categoria opsoninelor sau anticorpilor naturali;

— faza de înglobare, inițiată prin formarea unei invaginări a membranei care se adîncește treptat, pînă cînd se închide deasupra moleculei sau particulei încluzînd-o într-o vacuolă intracitoplasmatică, ce poartă numele de fagozom;

— faza de digestie a materialului fago(pino)citat, prin enzimele de tip lizozomal debutează prin apropierea și apoi contopirea fago(pino)zomului cu un lizozom, rezultînd un fago(pino)-lizozom. La nivelul acestuia se produce degradarea materialului fago-(pino)citat prin procese enzimatice în care predomină reacțiile oxidative și cele de hidroliză. Majoritatea enzimelor decelate în cursul digestiei intrafagocitare sînt de tipul oxidazelor, al mieloperoxidazei și a hidrolazelor acide.

În faza de digestie se poate constata o destul de mare diversitate în comportarea materialului fagocitat, în funcție de starea imunologică în care este implicat procesul de fago(pino)citoză:

— digestia completă, constînd în degradarea materialului fago(pino)citat pînă la produși finali, este un fenomen constant în cazul fagocitelor polimorfonucleare și frecvent în cazul macrofagelor; metabolizarea totală a particulelor ingerate este un mecanism nespecific caracteristic imunității naturale;

— digestia parțială a non selfului în proporție ajungînd pînă la 90%, dar cu păstrarea la suprafața macrofagului a aproximativ 10% din non self și purtarea acesteia la exteriorul celulei timp de cîteva săptămîni este un mecanism care intervine în imunitatea dobîndită și în fenomenele de alergie. De aceea, acest tip de fagocitoză poate fi numită și fagocitoză imună. Ea este un atribut exclusiv al macrofagelor, iar non selful fagocitat este antigenic. În fixarea antigenului pe suprafața macrofagului intervin și anticorpii citofili. Prezența acestor anticorpi este confirmată și prin evidențierea receptorilor Fc la nivelul membranei macrofagelor. Elementele antigenice păstrate pe suprafața celulei sînt ulterior oferite limfocitelor, după unul din modelele care vor fi descrise la capitolul de imunogeneză. Caracterele diferențiale între fagocitoza normală și cea imună sînt rezumate în tabelul II.1;

— persistența nealterată și menținerea viabilității unor bacterii patogene; exemplul clasic este cel al bacililor tuberculozei care nu numai că nu sînt digerați, dar rămîn vii, se multiplică, determină transformarea fagocitelor în celule gigante, iar acestea devin un mijloc de vehiculare a germenilor în organism;

— digestia unor tipuri de non self pe care fagocitele organismelor neimunizate în mod normal nu le digeră. În organismul animalelor cu imunitate antituberculoasă apar macrofage capabile să digere bacilii tuberculozei; aceste fagocite au prin urmare o comportare de sens contrar cu cele menționate anterior. Noua însușire dobîndită de aceste macrofage, numite acum imunofagocite, poate fi considerată ca un mecanism al imunității dobîndite, cu toate că gradul de specificitate al acestei transformări calitative celulare este redus. Imunofagocitele obținute cu bacilii tuberculozei manifestă aceleași proprietăți și față de brucele, salmo-

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul II.1

Caracterele distinctive între fagocitoza normală şi cea imună

Caracterul distinctiv	Fago(pino)citoza ca mecanism al imunităţii naturale	Fago(pino)citoza imună ca mecanism al imunităţii dobîndite
Celulele implicate	Microfagele polimorfonucleare şi macrofagele	Numai macrofagele
Categoria de non self	Toate categoriile	Numai antigenele
Factori care facilitează fixarea pe celulă	Numai opsonine (anticorpi naturali)	Şi anticorpii citofili fixaţi pe receptorii Fc ai macrofagului
Tipul de digestie	Totală	Parţială
Soarta materialului nedegradat	—	Este transmis limfocitelor

nele sau listerii, germeni caracterizaţi şi ei prin rezistenţă la digestia intrafagocitară.

2. *Interferonii* sînt produşi intracelulari, a căror elaborare a fost multă vreme corelată cu prezenţa intracelulară a virusurilor. Descoperirea lor a fost anticipată de studiul interferenţei virale, fenomen, care le-a inspirat mai tîrziu şi numele. Existenţa unor substanţe cu efect antiviral, prezente în celulele infectate a fost admisă ipotetic înaintea identificării interferonilor, încă din 1944, de Garde în celulele nervoase ale şoarecilor infectaţi cu virusul encefalomiocarditei; de Lennette şi Koprowski (1946) în culturile celulare infectate cu virusul febrei galbene; de Magamo şi Kojima (1954) în celulele infectate cu virusul vaccinal.

Isaacs şi Lindemann (1957) identifică fizico-chimic şi biologic substanţa mediatoare a interferenţei şi o numesc interferon.

Interferonii sînt glicoproteine macromoleculare, constituite din unităţi proteice cuplate cu lanţuri polizaharidice, cu grupări terminale de acizi sialici. Masa moleculară depinde de celula producătoare de interferon, variind între 25 000—160 000 daltoni. Uneori, chiar acelaşi tip de celule, ca de exemplu globulele albe umane, pot sintetiza interferoni cu mase moleculare foarte diferite. Carter explică variaţiile de masă moleculară pornind de la premisa unei unităţi monomer de 12 000 daltoni, din polimerizarea căreia rezultă diferiţii interferoni. Coppey presupune că variaţiile de masă moleculară se datoresc asocierii întîmplătoare de molecule active cu molecule inactive.

Interferonii grei sînt antigenic distincţi de cei uşori.

Sensibilitatea interferonilor faţă de factorii de mediu este asemănătoare cu cea a celorlalte proteine. Ei sînt distruşi prin încălzirea la 60°C timp de aproximativ o oră şi rezistă la variaţii de pH între limite foarte largi, de la 2 la 10.

Extracţia din celulă şi purificarea interferonilor este foarte dificilă.

Inducţia sintezei de interferon este condiţionată de pătrunderea virusului în celulă, indiferent dacă acesta este viu sau inactivat, fapt care atestă inexistenţa unei corelaţii între funcţia infecţioasă şi cea inductoare a virusului. Responsabilitatea inductoare directă pentru sinteza interferonilor revine acizilor nucleici virali şi mai ales acizilor ribonucleici. ARN bicatenar al reovirusurilor şi formele replicative de ARN, nou formate după replicarea genomurilor virale din ARN monocatenar, au o acţiune inductoare deo-

Scanned with OKEN Scanner

sebit de eficace. Acizii deoxiribonucleici sînt în general slab inductori.

Ulterior s-a demonstrat posibilitatea inducţiei de interferon şi cu acizi ribonucleici de origine nevirală cum sînt cei extraşi din celule heteroloage. F i e l d şi col. (1967) au reuşit să inducă interferoni cu acizi nucleici de sinteză, cum sînt complexul bicatenar de homocopolimere de acid riboinozinic şi acid ribocitidilic (poli I-poli C).

Inducţia de interferoni sau de inhibitori cu acţiune analoagă poate fi şi rezultatul acţiunii unui sortiment variat de substanţe chimice (fitohemaglutinina, statolonul, helenina, ciclohexamida, polimerii anionici sintetici, kanamicina, endotoxinele bacteriene), microorganisme (rickettsiile, micoplasmele, brucelele, listeriile, *Francisella tularensis* etc.) şi paraziţi (agentul maleriei, toxoplasmele).

Mecanismul de acţiune al interferonilor se realizează prin fixarea acestora pe receptorii prezenţi la suprafaţa celulelor. Interferonii se adsorb pe receptori indiferent de temperatură, dar acţionează numai la 37°C. Interferonii nu acţionează asupra virusurilor direct, ci printr-un mecanism cooperant între receptori şi un sistem activator, care declanşează sinteza unei proteine antivirale. Acest mecanism de activare nu implică pătrunderea interferonilor în interiorul celulei, fiind suficient numai contactul lor cu receptorii. În celulele tratate cu interferon, proteina antivirală apare în aproximativ 4 ore. Acţiunea acestei proteine se exercită asupra sintezei proteinelor virale precoce, mai ales asupra celor enzimatice, respectiv ARN — polimerazele, în cazul virusurilor ARN şi ADN — polimeraze, în cazul virusurilor ADN.

Interferonii sînt lipsiţi de specificitate faţă de un anumit virus, avînd în general specificitate de celulă şi de specie animală, dar şi aceasta este relativă. Astfel, s-a constatat că în unele cazuri interferonii produşi de celulele unei specii, pot fi activi în celulele altei specii; de exemplu, interferonii elaboraţi de globulele albe umane pot avea efecte şi asupra celulelor de maimuţă; cei produşi de fibroblaste embrionare umane acţionează cu un efect chiar mai mare în celulele heteroloage de rinichi de iepure etc. În ultimul timp s-a constatat că efectele inhibitorii ale interferonilor asupra sintezei de proteine, nu se rezumă numai la cele virale, extinzîndu-se şi asupra proteinelor celulare, fapt care determină la rîndul lui diminuarea capacităţii de multiplicare a celulelor, în special a celor canceroase. În cazul tumorilor maligne acţiunea interferonilor este orientată în două direcţii: a) inhibarea dezvoltării procesului malign indiferent de factorul cancerigen; acest fapt a fost demonstrat în cazul unei mari varietăţi de tumori experimentale, inclusiv cele induse chimic (L e n y şi R o b s o n, 1968, 1969, citaţi de S i m u, 1978); b) inhibarea sintezei de material viral în cazul tumorilor cu etiologie virală.

Mai recent s-a constatat că interferonii pot influenţa şi unele mecanisme de imunitate celulară. S k u r k o v i c h şi col. (1978) arată că interferonul indus cu ajutorul virusului pseudopestei aviare (Newcastle) este capabil să confere proprietăţi citotoxice unor linii de limfocite umane normale.

F o u r n i e r şi col. (1968) au pus în evidenţă un factor tisular antagonist faţă de interferon, extras din ţesutul corioamniotic uman.

Unele substanţe ca actinomicina D, potenţează acţiunea antivirală a interferonilor, mărind-o de 10—100 ori. În acelaşi timp, ea este capabilă să anihileze complet efectul antiinterferon al factorului tisular menţionat. Potenţarea acţiunii interferonului pare a fi corelată cu blocarea sintezei unei proteine, care la rîndul ei controlează sinteza proteinei antivirale.

Acţiunea interferonilor *in vivo* este diferită ca durată şi intensitate, de cea

Scanned with OKEN Scanner

in vitro. În timp ce în organism efectul antiviral este trecător, în culturi celulare este durabil, transmiţîndu-se la 5—6 generaţii consecutive.

Sinteza de interferoni este determinată genetic de secvenţe ale genomului celular. Pe baza experienţelor executate de Cassingena şi col. (1970), citaţi de Hannoun (1976), aceste secvenţe sînt concentrate într-un mic cromozom subtelocentric. Acesta codifică sinteza interferonului, neavînd însă nici o responsabilitate în determinismul rezistenţei antivirale, ceea ce constituie un argument în plus pentru independenţa sintezei interferonului faţă de infecţia virală.

Informaţia genetică responsabilă de sinteza proteinei antivirale este situată pe un cromozom diferit de cel care codifică sinteza interferonului.

Reglarea sintezei interferonului pare a fi realizată prin 4 mecanisme (după Hannoun, 1976);

— acţiunea unor represori („clocker", „depressor"), care intervin ca mecanisme de control precoce şi tardiv;

— retroinhibiţia proteinei antivirale asupra genei responsabile de sinteza interferonului;

— acţiunea directă a proteinei antivirale asupra acidului nucleic inductor;

— acţiunea cooperantă a celor trei mecanisme mai sus citate.

Posibilităţi de utilizare a interferonilor în profilaxia şi terapia infecţiilor virale: Speranţele puse iniţial în aplicabilitatea interferonilor, ca mijloc profilactic şi terapeutic antiviral, au fost doar parţial satisfăcute, principalele cauze fiind: dificultăţile în extracţie şi purificare, specificitatea de specie şi celulă, eliminarea rapidă prin extracţii, fragilitatea la acţiunea factorilor de mediu — în special la enzime.

Utilizările cu o oarecare perspectivă sînt orientate în două direcţii:

— Administrarea de interferon exogen pe cale intravenoasă, extras pe cît posibil din celule provenind de la specia omoloagă, metodă care a dat rezultate bune mai ales în cazul unor virusuri oncogene.

— Stimularea producţiei de interferon endogen prin inocularea de virusuri inactivate ori temperate, a acizilor nucleici de sinteză (poli I-poli C) sau a altor substanţe inductoare (statolon). Vaccinarea cu virusuri vii şi atenuate, mai ales în cazul unor virusuri ARN, ca de exemplu virusul pestei porcine, produce, pe lîngă imunizarea activă şi inducţia de interferon, efectul profilactic al vaccinului amplificîndu-se prin cooperarea ambelor mecanisme antivirale.

Stimularea producţiei de interferon este mai uşor de realizat şi are, se pare, perspective mai mari de a putea fi cîndva introdusă pe o scară mai largă atît în terapia antivirotică, cît şi în cea anticanceroasă.

Amplasarea interferonilor printre factorii imunităţii naturale s-ar putea să nu aibă acordul unanim al tuturor imunologilor, ţinînd seama de faptul că ei nu se găsesc în organismul normal, fiind elaboraţi consecutiv acţiunii unor factori patogeni. Multitudinea proceselor care determină sinteza lor şi în care intervin, efectul lor faţă de non self şi lipsa de specificitate a acestui efect pledează însă pentru acceptarea lor în cadrul arsenalului de factori ai imunităţii naturale.

Complementul şi properdina, factori umorali ai imunităţii naturale despre care s-au acumulat de asemenea multiple cunoştinţe noi în ultimele decenii, urmează a fi inseraţi printre efectorii imunităţii dobîndite. Această aşezare se justifică prin faptul că, deşi nespecifici, aceşti factori mediază numeroase procese şi reacţii specifice ale imunităţii dobîndite şi hipersensibilităţii, înţelegerea modului lor de acţiune fiind mai accesibilă în acest context.

Scanned with OKEN Scanner

II. 2. Imunitatea dobîndită (inductibilă)

Imunitatea dobîndită (inductibilă) este starea de rezistenţă a organismului faţă de factorii „non self" antigenici, realizată prin structuri şi funcţii de neoformaţie, cu un înalt grad de specificitate pentru antigen. Imunitatea dobîndită are acelaşi determinism ca şi alergia sau hipersensibilitatea, de care diferă numai prin consecinţele diferite pentru organism ale reacţiei antigenului cu efectorii imuni. În cazul imunităţii dobîndite, prezenţa efectorilor imuni duce la rezistenţa organismului, iar în cazul alergiei la sensibilizarea acestuia faţă de antigen.

Principalele caracteristici ale imunităţii dobîndite sînt următoarele:

— sfera ei de cuprindere se referă numai la unii indivizi dintr-o specie capabilă să producă un răspuns imun faţă de un anumit antigen (are un caracter individual);

— prima treaptă filogenetică pe care apare este reprezentată de vertebrate, iar complexitatea factorială a determinismului ei este în relaţie directă cu nivelul treptei filogenetice;

— momentul apariţiei poate fi oricînd în cursul dezvoltării ontogenetice a individului matur imunologic şi este dependent de pătrunderea în organism a antigenului;

— este un caracter netransmisibil ereditar; numai în unele cazuri se poate transmite vertical de la mamă la făt;

— efectorii imunităţii dobîndite sînt constituiţi din structuri şi funcţii de neoformaţie de natură umorală (anticorpii sau imunoglobulinele) şi celulară (limfocitele reactive sau specific sensibilizate şi alte tipuri de celule);

— acţiunea acestor efectori este specifică şi diferenţiată în funcţie de antigen;

— în determinismul acestei stări sînt implicate mecanisme de memorie.

Imunitatea dobîndită se poate clasifica după mai multe criterii:

1. Prezenţa antigenului şi participarea organismului la elaborarea efectorilor imuni, criteriu după care imunitatea dobîndită poate fi împărţită în:

a) *imunitate activă*, în care antigenul pătrunde în organism pe căi naturale (spontane, accidentale), de regulă printr-o infecţie naturală, sau pe căi artificiale, în mod voit (dirijat, prin practici medicale sau medical-veterinare) — prin vaccinare; imunitatea activă se instalează în 6—10 zile, timp necesar producerii efectorilor imuni şi este de lungă durată, în funcţie de capacitatea imunogenă a materialului imunizant; poate dura de la cîteva săptămîni, luni şi în cazul unor antigene, mai mulţi ani şi chiar toată viaţa;

b) *imunitatea pasivă*, în care antigenul nu vine în contact cu organismul, care nu-şi produce singur efectorii imuni, primindu-i însă prin transfer de la un organism donator cu o stare de imunitate activă; prin analogie cu imunitatea activă, imunitatea pasivă poate fi dobîndită pe căi naturale — prin transferul efectorilor imuni, de cele mai multe ori a celor umorali de la mamă la făt transplacentar, la speciile cu placenta hemocorială şi colostral la speciile cu alte tipuri de placentă sau pe căi artificiale — prin serumizare sau transfer de celule. Imunitatea pasivă se instalează chiar în momentul transferului efectorilor imuni şi este de scurtă durată, de la cîteva zile la două-trei săptămîni.

2. Tipul predominant de efectori imuni, criteriu după care pot fi deosebite următoarele tipuri de imunitate:

a) *imunitate de tip umoral* în care responstabilitatea stării de rezistenţă revine anticorpilor (imunoglobulinelor), care predomină şi au capacitatea

Scanned with OKEN Scanner

de a anihila efectul nociv al antigenului;

b) *imunitate de tip celular*, în care starea de rezistenţă se datoreşte diferiţilor efectori celulari.

Sînt relativ puţine antigenele care determină imunitate de tip exclusiv umoral sau celular; în majoritatea cazurilor, cele două categorii de efectori imuni coexistă şi acţionează cooperant în realizarea stării de imunitate.

3. Persistenţa antigenului viu ca factor condiţionant al stării de imunitate. După acest criteriu imunitatea se poate clasifica în:

a) *imunitatea sterilă*, în care starea de imunitate nu este dependentă de persistenţa antigenului viu în organism şi

b) *imunitate nesterilă*, numită şi *premuniţie* sau *stare premunitivă*, care implică necesitatea prezenţei antigenului viu în organism.

Mecanismele prin care organismul recunoaşte antigenul, în care produce efectorii imuni şi în care aceştia pot reacţiona cu antigenul, sînt tratate pe larg în capitolele următoare.

Scanned with OKEN Scanner

III Antigenul

III. 1. Definiţie

Componentă esenţială şi primară a oricărui răspuns imun, antigenul reprezintă semnalul care declanşează o mare varietate de reacţii de apărare din partea sistemului imunitar complex al organismelor superioare. Proprietatea de a impresiona acest sistem şi de a determina răspunsuri adecvate aparţine *antigenelor*, în ultimă instanţă substanţe chimice complexe, cu origine foarte diversă.

Antigenele sînt definite ca substanţe care, în urma inocularii la animale vertebrate „străine" (diferite de specia de animal de la care provine antigenul), determină reacţii imunologice diverse. În general, se face distincţie între capacitatea de inducere a anticorpilor şi a altor răspunsuri imunologice, pe de o parte şi proprietatea de a reacţiona cu anticorpii. Ca urmare, funcţiile imunologice ale antigenelor sînt astfel definite:

— *imunogenitate*: proprietatea de a produce un răspuns imunitar manifestat prin formarea imunoglobulinelor specifice şi/sau a limfocitelor activate specific;

— *antigenitate*: capacitatea determinanţilor antigenici de a reacţiona cu imunoglobulinele şi de a se fixa la acestea precum şi de a reacţiona cu receptorii celulari;

— *alergenitate*: proprietatea de a determina reacţii alergice de diferite tipuri şi leziuni tisulare în urma unor sensibilizări prealabile, la indivizi la care a fost indusă formarea imunoglobulinelor specifice şi / sau a limfocitelor activate specific;

— *tolerogenitate*: proprietate de a produce lipsa capacităţii de răspuns imunologic.

III. 2. Factori determinanţi

Structura chimică reprezintă un element de cea mai mare importanţă, atît pentru definirea unui antigen cît şi pentru determinarea căilor de realizare a reacţiei imune şi a modului de manifestare a acesteia. Teoretic, proteinele şi glucidele — ca atare — sau compuşi care includ mai multe clase de substanţe, pot constitui antigene. Cei mai cunoscuţi sînt compuşii proteici care fac parte din structura antigenelor cu cea mai mare însemnătate pentru

patologia animală — virusuri, bacterii, paraziți. O însemnătate mare au și compușii polizaharidici, participanți cu pondere însemnată la edificiul antigenic al bacteriilor. Nucleoproteinele și lipidele au o contribuție directă mai puțin evidentă la inducerea unui răspuns imunitar; este însă la fel de adevărat că astfel de substanțe, dacă sînt cuplate cu proteinele bune antigenice, contribuie la realizarea unor antigene cu proprietăți antigenice noi, deosebite net de cele ale proteinei respective. Astfel, o serie de date experimentale atestă rolul unor lanțuri lipidice în formarea determinanților antigenici și importanța unor componenți lipidici în imunogenitatea macromoleculelor proteice și polizaharidice.

Mărimea moleculelor substanțelor chimice constituie o condiție esențială în definirea unui antigen. Este admisă necesitatea ca o substanță să aibă o greutate moleculară minimă de 3000—4000 pentru a fi imunogenă. Lipsa de imunogenitate a substanțelor cu greutate moleculară mică se explică, în parte, prin faptul că ele nu sînt fagocitate, ca urmare nu sînt „prelucrate" și nu oferă o informație adecvată, necesară declanșării mecanismelor imune. Cu toate acestea, nu a fost evidențiată, în toate cazurile, o corelație directă între dimensiunile moleculelor și imunogenitate.

Există și macromolecule aparent lipsite de capacitățile caracteristice unui antigen. În schimb, deși substanțele cu greutate moleculară mică nu sînt în general imunogene, sînt cunoscute exemple de compuși cu greutate moleculară (g.m.) mai mică de 5000 care induc răspunsuri specifice de diferite naturi: formare de anticorpi (calcitonina, cu g.m. 3600; gastrina, cu g.m. 2100; oxitocina, cu g.m. 1000), sensibilizare de tip întîrziat (peptide encefalitogene din kielină, cu g.m. 4000—5000; glucagon, cu g.m. 3500; peptide ACTH, cu g.m. 3000; angiotensina, cu g.m. 1030).

Substanțele chimice cu o constituție foarte simplă și cu o greutate moleculară mică, situată în jurul valorii 1000, sînt capabile să devină antigenice în condiții speciale: inoculare pe cale parenterală cu adjuvant de tip Freund, cuplare cu substanțe chimice proprii ale organismului gazdă.

Corelînd cunoștințele actuale privitoare la cooperarea dintre celulele T și B în procesul de inițiere a sintezei anticorpilor cu condițiile impuse unei substanțe pentru a fi definită ca antigenică, rezultă că, în ultimă instanță, inducerea răspunsului imun este realizabilă de către compuși cu cel puțin doi determinanți antigenici diferiți, avînd funcțiile de purtător și de haptenă. În același timp, este necesar ca între cele două grupări active să existe un spațiu suficient care să permită interacțiunea celulă-celulă.

Complexitatea structurii moleculei adaugă un element în plus la realizarea calității antigenice. Proteinele, care au o structură bine definită din punctul de vedere al configurației secundare, terțiare și chiar cuaternare, sînt substanțe cu proprietăți imunogenice evidente; în schimb, substanțele care au o structură simplă nu sînt capabile să inducă un răspuns imun (exemplu gelatina). Sînt citate exemple care arată rolul hotărîtor al structurii cuaternare în definirea specificității și imunogenității unei substanțe. Așa este cazul moleculelor de imunoglobuline, ale căror proprietăți antigenice sînt exprimate de prezența lanțurilor polipeptidice ale lanțurilor grele și ușoare sau al hemoglobinei la care unele diferențe în privința capacității de exprimare a fixării specifice a complementului sînt condiționate de modificări ale structurilor cuaternare. Schimbări ale structurii terțiare la unele substanțe modifică, de asemenea, în mod hotărîtor, antigenicitatea și specificitatea acestora: lizozimul, prin reducerea punților disulfidice urmată de carboximetilarea grupărilor

Scanned with OKEN Scanner

sulfhidril; ribonucleaza, prin oxidare cu acid performic. Se admite, în general, că reacţiile încrucişate ale anticorpilor faţă de antigenul iniţial sînt cu atît mai slabe cu cît molecula acestuia este mai mult modificată. Dealtfel, urmărirea modificărilor conformaţiei proteinelor asupra imunogenicităţii acestora oferă argumente deosebit de importante pentru demonstrarea relaţiei conformaţie — antigenicitate. Desfacerea legăturilor disulfidice, urmată de anularea conformaţiei globulare, determină o accentuată reducere a reactivităţii imunogenice şi antigenice. Anticorpii formaţi prin inocularea unor proteine cu conformaţie modificată nu reacţionează sau reacţionează foarte slab cu proteina de origine. Anticorpii faţă de proteina nativă (cu conformaţie „normală") sînt mai specifici decît anticorpii induşi de proteina modificată, cu conformaţie globulară anulată, şi nu au proprietatea de a recunoaşte asemănările de structură primară între proteinele înrudite din acest punct de vedere.

Reactivitatea încrucişată între proteine, evidenţiată prin teste serologice, poate fi utilizată în scopul stabilirii asemănărilor şi diferenţelor de conformaţie, între proteine înrudite. Această metodologie are unele limite: absenţa reactivităţii încrucişate nu semnifică uneori diferenţe mari de structură de nivel superior ci doar modificări ale unor aminoacizi situaţi la suprafaţa moleculei; de asemenea, nu toate modificările conformaţionale au un efect semnificativ asupra antigenicităţii.

Structura cuaternară a proteinelor introduce un tip deosebit de determinanţi antigenici conformaţionali a căror specificitate este dată de lanţurile polipeptidice adiacente în spaţiu. Astfel de determinanţi pot fi realizaţi prin asamblarea proteinelor sau a polimerilor ca şi prin formarea unor complexe moleculare noi — aşa cum este cazul agregatelor antigen-anticorp. Anticorpii sintetizaţi faţă de antigene de acest fel vor recunoaşte numai structurile cuaternare respective, nu şi polipeptidele componente izolate.

Moleculele mari, polimerii cu structuri complexe, sînt în general dotate cu proprietăţi imunogene superioare proteinelor monomerice sau de dimensiuni reduse. Agregarea unor substanţe proteice slab imunogene modifică substanţial comportarea acestora şi determină realizarea unor răspunsuri evident mai intense. Mai mult decît atît, anularea stării de agregare este însoţită de reducerea evidentă a imunogenicităţii şi de realizarea proprietăţii de a induce starea de toleranţă imunologică. Creşterea capacităţii imunogenice a polimerilor proteici faţă de monomeri este explicată prin ratele diferite ale eliminării din circulaţie şi ale metabolizării după inoculare, prin modificările conformaţionale — inclusiv realizarea unor structuri cuaternare — şi prin stimularea directă a limfocitelor de tip B de către polimeri. Ca urmare, aceşti antigeni polimerizaţi au fost denumiţi *timus-independenţi*. Producerea anticorpilor este iniţiată de aceştia fără participarea limfocitelor T.

Rigiditatea structurală a moleculei constituie, de asemenea, o condiţie care asigură constanţa structurii şi în special a poziţiei grupărilor antigenice determinante. Stabilitatea compoziţiei şi a structurii spaţiale a antigenului este cea care oferă condiţiile necesare pentru recunoaşterea şi transmiterea informaţiei de la celulele fagocitare la celulele limfoide care sintetizează anticorpii. Această proprietate este dependentă de rezistenţa antigenilor faţă de factorii chimici şi enzimatici întîlniţi în organismul inoculat. Folosirea adjuvanţilor asigură, printre altele, o stabilitate crescută a antigenelor.

A r n o n (1974) evidenţiază importanţa hotărîtoare a structurii fizicochimice a antigenelor, cu precădere a conformaţiei spaţiale, pentru determinarea specificităţii acestora, îndeo-

Scanned with OKEN Scanner

sebi în cazul răspunsului imunologic prin anticorpi umorali, mai puţin pentru cel mediat celular. Modificările de structură şi de conformaţie nu determină anularea imunogenităţii dar specificitatea se schimbă în mod semnificativ. Rezultă de aici existenţa unor determinanţi antigenici *„secvenţiali"*, diferiţi ce cei *„conformaţionali"* (aceştia din urmă, dependenţi de structura sterică-secundară, terţiară sau cuaternară). Un exemplu în acest sens este constituit de mioglobină; grupul „ferihem", cel care conferă structură terţiară moleculei, asigură şi o antigenicitate diferenţiată faţă de substanţa lipsită de acesta.

Inducerea sintezei de anticorpi, a hipersensibilităţii mediate celular sau a toleranţei imunologice depinde, în bună măsură, de structura antigenelor. Modificările chimice ale unui antigen determină şi schimbarea intensităţii celor trei tipuri de răspuns. Astfel, prin acetoacetilarea flagelinei (*Salmonella adelaide*), este anulată formarea anticorpilor, în schimb se intensifică sensibilizarea de tip tardiv şi apare capacitatea de inducere a toleranţei (P a r i s h - 1974).

Prezenţa unor grupări chimice asigură specificitatea moleculei de antigen. Încă din 1913, W e l l s şi O s b o r n e au demonstrat importanţa structurii chimice a antigenului în reacţiile imune, arătînd că specificitatea moleculelor de anticorpi este dependentă de structura chimică a unor porţiuni din molecula de antigen. Ulterior, L a n d s t e i n e r şi c o l. (1945) au introdus în molecule de antigen substituenţi cu greutate moleculară mică (haptene) realizînd prin aceasta modificarea specificităţii antigenice a macromoleculelor.

Determinanţi antigenici. Cercetări, devenite clasice, ca şi cele care au urmat, au dovedit importanţa componentelor structurale ale moleculelor de antigen faţă de care este realizată specificitatea moleculelor de anticorpi; aceste componente sînt în prezent cunoscute ca *determinanţi antigenici*, grupări chimice faţă de care este îndreptată specificitatea anticorpilor. În general se consideră că determinanţii antigenici şi situsurile de combinare ale anticorpilor au o configuraţie complementară, care condiţionează cuplarea în reacţiile antigen-anticorp, prin legăturile de hidrogen, hidrofobe şi ionice ca şi prin cele de tip van der Waals.

Caracterizarea determinanţilor antigenici depinde în cea mai mare măsură de obţinerea unui antiser specific şi suficient de activ şi de sensibilitatea şi capacitatea de discriminare a metodelor folosite. Este de asemenea utilă descrierea detaliată a determinanţilor prin metode fizice.

Date cu privire la localizarea, numărul, dimensiunea şi structura determinanţilor care reacţionează cu anticorpii pot fi acumulate prin izolarea fragmentelor active din moleculele de antigen şi prin compararea antigenicităţii proteinelor omoloage sau modificate. Metodele aplicate în mai mare măsură în această direcţie sînt:

— *inhibiţia haptenică*, bazată pe determinarea capacităţii unor fragmente antigenice de a inhiba reacţiile dintre antigenul integral şi serul anti-antigen integral; reacţiile aplicate pot fi teste de precipitare, fixare a complementului etc. F u c h s şi c o l. (1973) au introdus metoda bacteriofagului modificat chimic pentru cercetarea activităţii fragmentelor de nuclează stafilococică;

— *microfixarea complementului*, metodă care permite evidenţierea diferenţelor între determinanţii antigenici ai unor proteine în mai mare măsură decît macrofixarea şi precipitarea cantitativă, probabil ca urmare a folosirii concentraţiilor scăzute de reagenţi.

Determinanţii antigenici ai polipeptidelor sînt reprezentaţi de părţi active ale lanţului proteic, alternate cu regiuni inactive. Numărul regiunilor active este în general redus; în acest sens sînt avansate valori de

Scanned with OKEN Scanner

doi determinanţi antigenici la un lanţ polipeptidic cu greutatea moleculară de aproximativ 10 000. Astfel, un fragment al albuminei serice umane, cu greutatea moleculară 6 600 include un singur determinant. Sînt exemple care nu respectă aceste valori (calcitonina M, cu greutatea moleculară 3 600 are doi determinanţi antigenici), fapt care atestă şi variabilitatea numărului de determinanţi, dar numai în cadrul unui număr finit, condiţionat de dimensiunea moleculei.

Este stabilit că, în general, polipeptidele de dimensiuni mari sînt mai active din punct de vedere antigenic decît cele mai mici. Contribuţia diferiţilor aminoacizi la construcţia regiunilor active nu este egală, fapt care a condus la crearea noţiunii de *grup imunodominant* — reprezentat de porţiunea de dimensiuni extrem de reduse uneori, care are o importanţă hotărîtoare în activitatea întregii molecule. Porţiunile din moleculă inactive cînd aceasta este nemodificată, sînt denumite „ascunse" sau „tăcute".

În cazul proteinelor globulare, determinanţii antigenici sînt situaţi la suprafaţa moleculei în regiunile cele mai „expuse" ale acesteia, în special la „colţurile" lanţurilor polipeptidice pliate şi în porţiunile terminale ale proteinelor nepliate. De aici rezultă că prelucrarea antigenului nu este necesară pentru inducerea răspunsului imun, cel puţin în faza de recunoaştere a antigenului (Wright şi Rothberg, 1971). Porţiunile „ascunse" în cadrul moleculei sînt inactive din punct de vedere imunologic. Rezultă că antigenitatea este o expresie a structurilor de suprafaţă şi poate fi folosită pentru stabilirea modificărilor acesteia.

Determinanţii antigenici care iniţiază răspunsul imunologic mediat prin anticorpi sînt diferiţi de cei care induc imunitatea mediată celular şi care reacţionează cu anticorpii fixaţi la celule. În acest sens, este dovedit că unele proteine înrudite nu reacţionează încrucişat cu anticorpii umorali dar au proprietatea de a prezenta reacţii încrucişate cu anticorpii purtaţi de receptorii celulari. Există de asemenea argumente directe ale prezenţei unor determinanţi antigenici distincţi pentru cele două tipuri de imunitate, în cazul unor fragmente proteice izolate care au fost active în inducerea hipersensibilizării de tip întîrziat dar nu au reacţionat cu anticorpii umorali induşi prin inocularea proteinei originare integrale.

Acest principiu nu se aplică tuturor determinanţilor antigenici. Dealtfel, este în prezent demonstrat faptul că pentru provocarea unui răspuns imediat celular condiţiile pe care trebuie să le îndeplinească antigenul sînt mai puţin severe; unele substanţe cu greutate moleculară mai mică pot induce o stare de hipersensibilizare de tip celular dar nu şi biosinteză de anticorpi. Pe de altă parte, unele proteine denaturate pierd capacitatea de a iniţia răspunsul umoral prin imunoglobuline specifice, păstrîndu-şi intacte posibilităţile de a produce imunizarea de tip celular. Mai mult decît atît, este admis că antigenele cu un singur determinant (monovalente) sînt capabile să inducă stări de hipersensibilizare de tip întîrziat dar nu şi sinteza anticorpilor.

A fost amintită diferenţierea care se face între caracterele antigenelor care determină *specificitatea* şi cele care asigură *imunogenitatea* — proprietatea unei molecule de a induce un răspuns imun celular sau umoral. Astfel de fragmente moleculare sînt cunoscute ca *determinanţi imunogenici*.

Numărul de grupări determinante constituie *valenţa antigenului*; în cadrul reacţiilor antigen-anticorp această proprietate se exprimă prin numărul maxim de molecule de imunoglobuline specifice care se cuplează cu o moleculă de antigen.

Caracterele stereochimice ale moleculei de antigen intervin în determinarea specificităţii antigenului. Poziţia diferită a unor grupări chimice la com-

Scanned with OKEN Scanner

pușii dextro-, levo- și mezo-, la compușii orto-, meta- și para- ca și la antigenele glucozidice și galactozidice modifică răspunsul prin anticorpi, fapt care atestă marea capacitate de discriminare a sistemului imunitar. Complexările cu grupări haptenice în pozițiile orto-, meta- sau para- realizează derivați chimici care induc sinteza unor anticorpi de înaltă specificitate cu ajutorul cărora, prin teste de precipitare, pot fi diferențiate antigenele omoloage de cele heteroloage, chiar dacă deosebirile dintre acestea rezidă numai în poziția diferită a grupării haptenice.

Poliaminoacizii cu configurație optică dextro- sînt, în general, slab imunogeni sau neimunogeni dar constituie determinanți compleți sau parțiali cînd sînt complexați cu polipeptide.

Reacțiile încrucișate de intensitate redusă între antigene și anticorpi heterologi sînt explicate și prin o racemizare parțială a compușilor testați. În unele situații, D-aminoacizii pot fi superiori compușilor stereoizomerici corespunzători, ca în cazul poli-DL-alanil-proteinelor la care polipeptidele sînt amestecuri ale celor doi izomeri; anticorpii induși de determinanții antigenici respectivi sînt specifici pentru D-aminoacizi și în mai mică măsură pentru L-aminoacizii componenți.

Un alt element, hotărîtor în determinarea proprietăților antigenice ale unei substanțe, este definit prin **noțiunea de „străin“** (în engleză: *non self*, termen uzual folosit în literatura de specialitate în orice limbă). Noțiunea descrie calitatea unei substanțe de a *nu* proveni din organismul la care urmează să fie inoculată, de a fi deci străină față de acesta. Prin extinderea sferei acestei definiții, se admite, din rațiuni strict practice, că pentru a fi considerată străină o substanță trebuie să provină de la o altă specie de animal decît cea care urmează să primească, pe o cale sau alta, un antigen. Imunogenicitatea unei substanțe este cu atît mai evidentă cu cît ea provine de la un donator cît mai depărtat din punct de vedere filogenetic de specia căreia îi aparține animalul primitor. În ultimă instanță această diferențiere rezidă în structura chimică diferită. Ca urmare, absența acestor deosebiri în cazul unor substanțe care provin de la specii diferite anulează caracterul lor antigenic; de asemenea, existența unor diferențe minore de structură chimică față de substanța similară din organismul primitor determină răspunsuri imune de slabă intensitate. Capacitatea de discriminare a organismului în procesul de recunoaștere imunologică este deosebit de accentuată, putînd să se exprime prin sesizarea secvențelor diferite ale aminoacizilor și chiar a prezenței unui singur aminoacid care este absent la proteinele corespondente proprii.

Realizarea unor modificări chimice la substanțele proprii unui organism creează pentru acestea condiția de bază pentru a deveni antigenice. Astfel de modificări au fost realizate *in vitro* în condiții experimentale; s-a demonstrat astfel, de exemplu, că proteinele serice (globuline, albumină) devin antigenice pentru organismul de la care provin după inducerea unor modificări chiar de mică importanță. Modificări de aceeași natură se pot realiza *in vivo* în urma evoluției unor stări patologice sau prin asigurarea contactului cu celulele imunocompetente ale unor țesuturi sau componente ale acestora care în mod obișnuit au un statut de „izolare” și nu pătrund în torentul circulator (cristalin, tiroidă, testicul etc.). În ambele cazuri, organismul răspunde față de *autoantigenele* create prin imunoglobuline specifice, *autoanticorpii*. Fenomenul este în majoritatea cazurilor dăunător organismului, el stînd la baza proceselor de *autoimunitate*.

Asigurarea unui timp suficient pentru captarea antigenului, prelucrarea acestuia și „prezentarea” ulterioară a informației antigenice celulelor care participă la realizarea unui răspuns reprezintă o condiție importantă. Eliminarea rapidă din organism, mai ales în cazul unor compuși cu proprietăți

Scanned with OKEN Scanner

antigenice relativ slab exprimate, conduce la nerealizarea unui răspuns imun decelabil.

Specificitatea antigenică constituie un factor esenţial în definirea antigenelor şi a răspunsului imun indus de acestea. Specificitatea oricărui antigen rezidă, în ultimă instanţă, în compoziţia sa chimică, aceasta permiţînd diferenţierea, prin metode imunochimice, a originii unor substanţe complexe (proteine serice) sau extracte tisulare. Elementul esenţial al compoziţiei chimice, care determină specificitatea unei substanţe, este structura în aminoacizi, inclusiv secvenţa acestora în cadrul lanţurilor polipeptidice. La rîndul lor, glucidele care fac parte din componenţa unor antigene pot constitui un factor esenţial al specificităţii, aşa cum este cazul polizaharidelor bacteriilor Gram negative; la acestea, situsurile specifice sînt reprezentate de cîteva zaharuri.

III. 3. Haptenele

Haptenele care fac parte din structura unui complex antigenic au un rol hotărîtor în determinarea specificităţii. Răspunsul în anticorpi este îndreptat în mod evident atît faţă de situsurile antigenice pe care le reprezintă haptena cît şi faţă de cele ale proteinei la care este cuplată.

Haptenele, substanţe cu greutate moleculară redusă, nu sînt capabile să inducă formarea anticorpilor specifici atunci cînd sînt inoculate singure la un animal primitor. În schimb, în urma inocularii unui conjugat haptenă-proteină „purtătoare" se realizează răspunsul imun, cu inducerea sintezei anticorpilor diferiţi faţă de proteină şi faţă de haptenă.

Haptenele sînt, în general, compuşi chimici cu greutate moleculară mică; există însă şi o serie de substanţe cu greutate moleculară relativ mare (polipeptide, glucide) care nu sînt antigenice ca atare.

Haptenele sînt clasificate în funcţie de specificitate, capacitatea de combinare cu anticorpii, formarea precipitatelor şi stimularea producerii de anticorpi.

După Mesrobeanu şi Păunescu (1975), haptenele sînt de două categorii:

— *precipitante*, cu o structură suficient de complexă pentru a avea specificitate imunologică şi a participa la realizarea precipitării în contact cu anticorpii omologi; nu induc formarea de anticorpi;

— *inhibitorii şi neprecipitante*, cu o structură chimică mai simplă, incapabile de a determina un răspuns imun anticorpoformator; reacţionează cu anticorpii omologi dar nu formează precipitate cu aceştia.

III. 4. Condiţii de imunogenitate şi antigenitate

După Atassi (1975), studiile privind condiţiile de antigenitate şi imunogenitate permit stabilirea unor concluzii aplicabile în special antigenelor proteice:

— prezenţa determinanţilor activi la suprafaţa moleculelor atestă că antigenele nu sînt scindate în primele faze ale procesului imunologic;

— regiunile antigenic active sînt bine delimitate;

— ariile antigenic active sînt de mici dimensiuni (6 sau 7 aminoacizi);

— în zonele active ale antigenelor predomină aminoacizi dotaţi cu proprietăţi hidrofobe (lizină, acid aspartic, serină etc.); cuplarea anticorpilor la aceşti aminoacizi implică interacţiuni

Scanned with OKEN Scanner

ionice; în cazul existenţei unor grupări hidrofile, se vor realiza interacţiuni hidrofile;

— reactivitatea antigenelor proteice este determinată în primul rînd de conformaţia lor; modificări, chiar minore, ale acesteia sînt urmate de schimbarea imunogenicităţii şi antigenicităţii;

— prezenţa unor regiuni antigenice active similare la două substanţe diferite determină ca serurile obţinute cu fiecare dintre cele două substanţe să reacţioneze încrucişat cu fiecare antigen; gradul de similitudine între antigene poate să fie limitat la un singur determinant antigenic; cu cît numărul de determinanţi similari este mai mare, cu atît gradul de reactivitate încrucişată va fi mai mare.

III. 5. Categorii de antigene

În funcţie de originea lor, antigenele se grupează în: *substanţe sintetice* (preparate în condiţii de laborator), *substanţe artificiale* (formate din haptene cuplate la molecule purtătoare) şi *substanţe naturale*. În continuare, vor fi prezentate principalele date cu privire la antigenele naturale.

Antigene definite prin structura chimică. După cum s-a arătat, un factor al activităţii antigenelor este reprezentat de natura chimică a acestora.

Proteinele sînt substanţele chimice cele mai bine cunoscute din acest punct de vedere.. În funcţie de realizarea unor condiţii de structură, conformaţie, dimensiune a moleculei, ca şi a condiţiilor de natură biologică, proteinele — ca atare sau în cadrul unor compuşi — au rol preponderent în determinarea răspunsurilor imunologice. În marele grup al proteinelor au fost constatate, de numeroşi autori, diferenţe importante ale capacităţii imunogenice şi antigenice. Acestea se explică prin diferenţele de structură (primară, secundară, terţiară, cuaternară), de prezenţa unor grupări antigenice etc. Studiul secvenţei aminoacizilor la unele proteine a demonstrat importanţa deosebită a acesteia, scoţîndu-se în evidenţă faptul că unele grupări de acizi aminaţi, o anumită lungime a lanţurilor, prezenţa aminoacizilor aromatici determină o creştere a capacităţii imunogene. Realizarea unor substituiri în moleculele de antigene creează compuşi cu proprietăţi superioare din punctul de vedere al imunogenităţii, dar depăşirea unor limite de substituire determină schimbarea specificităţii.

În privinţa imunogenicităţii conferite polipeptidelor din care fac parte, au fost constatate diferenţe evidente între aminoacizi. Astfel, acizii aminaţi aromatici şi, în general, structurile ciclice contribuie la creşterea gradului de imunogenicitate a moleculei, părînd să constituie adevărate centre determinante. Tirozina este unul dintre aminoacizii cu calităţi imunogenice superioare, de exemplu în comparaţie cu alanina.

În cazul proteinelor, pe lîngă dimensiunea moleculei, un rol mai important chiar revine prezenţei unor grupări determinante active. În schimb, sarcina electrică a moleculelor şi configuraţia optică nu constituie factori esenţiali ai imunogenităţii; totodată, nu trebuie omisă intervenţia factorului configuraţie optică la modificarea specificităţii antigenelor.

În comparaţie cu proteinele, *polizaharidele* sînt dotate cu proprietăţi imunogene mai puţin marcate. Numeroase substanţe polizaharidice sînt însă active în cadrul unor compuşi complecşi. Atît compuşii polizaharidici lineari cît şi cei ramificaţi au proprietăţi antigenice evidente, desigur cu modificările corespunzătoare de spe-

Scanned with OKEN Scanner

cificitate determinate de structură. O serie de polizaharide, prezente în structura bacteriilor, au un rol în determinarea specificității răspunsului imunologic față de acestea. Așa este cazul compușilor glucidici ai pneumococilor, salmonelelor, colibacililor etc. Dintre aceștia, au fost studiați în special compușii polizaharidici ai pneumococilor — polimeri ai acidului celobiouronic și glucozei.

Majoritatea antigenelor polizahariridice constau din determinanți antigenici identici sau foarte asemănători, dispuși la intervale regulate. Acest aspect al structurii primare nu este întîlnit în mod obișnuit în cazul lanțurilor polipeptidice.

Substanțele glucidice au proprietăți imunogenice care se manifestă și prin inducerea și declanșarea stărilor de hipersensibilizare mediate umoral (prin anticorpi); astfel de fenomene se realizează atît prin unele polizaharide ca atare cît și, mai ales, prin haptenele glucidice componente ale unor antigene.

Stările de hipersensibilizare mediată celular pot fi induse și declanșate numai de către haptenele polizaharidice cuplate cu macromolecule proteice purtătoare.

Acizii nucleici sînt recunoscuți în primul rînd ca haptene și mai puțin ca antigene complete. Unii compuși sînt, în același timp, imunogenici și antigenici; numeroși compuși din această categorie nu sînt imunogenici dar pot participa la realizarea unor reacții serologice, cu anticorpi induși de antigene complexe în a căror structură sînt incluși. Antigenele ADN și respectiv ARN nu pot fi diferențiate între ele cu ajutorul serurilor hiperimune anti-ADN și anti-ARN.

Anticorpii anti-ADN și anti-ARN pot fi induși în urma unor procese imunologice naturale sau experimentale.

Încercările de a demonstra imunogenicitatea acizilor nucleici liberi au dat rezultatele contradictorii. Inocularea ADN purificat de diverse origini (timus, *E. coli*, celule tumorale etc.) la iepuri nu a fost urmată de obținerea unor răspunsuri decelabile prin mai multe teste serologice. În schimb, cu ADN din timus de vițel și micobacterii a fost indusă formarea anticorpilor fixatori de complement. Imunizarea cu ADN a dat rezultate mai constante în urma asocierii sale cu adjuvant Freund.

ARN din levure a determinat formarea de anticorpi care au reacționat și cu ARN de alte origini.

Poliribonucleotidele cu conformație dublu-helicoidală s-au dovedit a fi imunogenice fără a fi cuplate cu un „purtător" proteic, iar la șoarecii MZB/MZW chiar fără a se folosi adjuvantul Freund.

Un fenomen deosebit de interesant este reprezentat de existența spontană a anticorpilor anti-acizi nucleici la pacienții umani cu lupus eritematos sistemic.

Lipidele intervin în fenomenele imunitare în special în cadrul unor compuși cărora le asigură caracterul de specificitate; astfel, cardiolipina este capabilă să determine producerea de anticorpi similari celor care reacționează în testul serologic pentru depistarea treponemelor.

Antigene virale și bacteriene. *Antigenele virale* reprezintă o categorie importantă de factori imunologici, avînd în vedere rolul deosebit al acestora în evoluția infecțiilor virale precum și în imunoprofilaxie și diagnostic (fig. 1).

Virusurile sînt în general antigene dotate cu mare capacitate de inducere a răspunsurilor imunitare — fapt datorat în primul rînd posibilităților de multiplicare în organismele-gazdă. În evoluția acestui proces sînt produse mai multe antigene: componente structurale ale virionului și enzime specifice implicate în edificarea moleculelor proteice structurale. În celule infectate cu virusuri variolice, au fost puse în evidență cel puțin 20 antigene prin teste de imunodifuziune dar mai

Scanned with OKEN Scanner

puţin de jumătate dintre aceştia sînt incorporaţi în virion.

O clasificare a componentelor antigenice ale virusurilor variolice include: proteina internă, legată de acidul dezoxiribonucleic (NP); proteina solubilă LS, care are doi determinanţi antigenici, dintre care unul termolabil (L) şi altul termostabil (S); antigenul care determină sinteza anticorpilor specifici neutralizanţi; alte antigene. Numai o mică parte din anticorpii induşi de aceste antigene au un rol semnificativ în protecţie.

În componenţa mixovirusurilor sînt cuprinşi: antigenul ribonucleoproteinic, la partea internă a virusului; antigene S diferite (pe baza prezenţei cărora se face, de exemplu, clasificarea virusurilor influenţei); antigene V, o hemaglutinină şi o neuraminidază.

După Ritchey şi col. (1977) virusurile influenţei includ în structura lor opt proteine.

Prin aplicarea testului de fixare a complementului se pot diferenţia la unele virusuri două componente antigenice: antigenul V (reprezentînd particulele virale infecţioase, uşor sedimentabile prin ultracentrifugare) şi antigenul S (cu greutate moleculară mai mică şi lipsit de capacitate imunogenă).

Dintre virusurile deosebit de imunogene pot fi citate: fagii, virusurile variolice, virusul pestei porcine clasice, virusul pseudopestei aviare; în schimb, virusul choriomeningitei limfocitare, virusul pestei porcine africane sînt foarte slab sau deloc imunogenice şi antigenice. Faptul că unele virusuri sînt foarte bune antigene este demonstrat şi de posibilitatea imunizării cu aceste virusuri inactive, deci lipsite de proprietatea de a se multiplica; este tot atît de adevărat însă că, de cele mai multe ori, virusurile inactivate sînt incluse în vaccinuri împreună cu un adjuvant, în scopul asigurării unui răspuns imun suficient de intens.

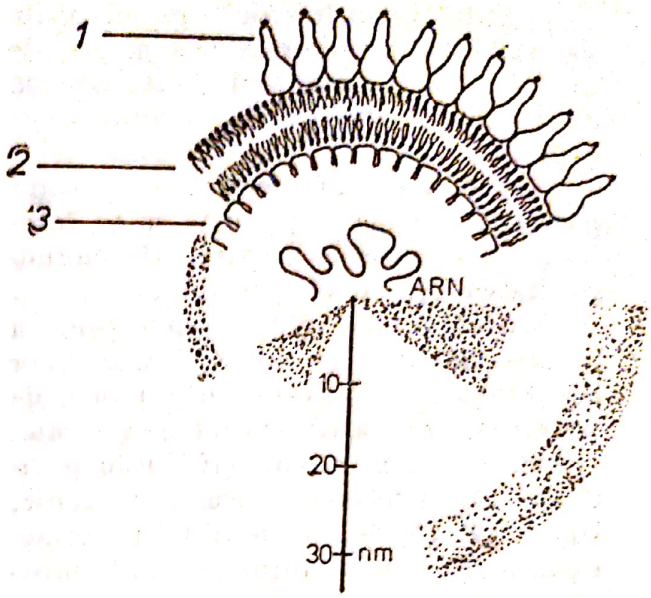


Fig. 1 — Structura unui α-virus cu plepomere glicoproteice (1) fixate la membrana lipidică (2) şi învelişul proteic (3). (După Harrison şi col.)

Capacitatea imunogenă a virusurilor rezidă în structura lor chimică complexă, incluzînd un acid nucleic (acidul ribonucleic sau acidul dezoxiribonucleic) şi, ca element preponderent, proteina cu rol protector pentru acidul nucleic. Învelişul proteic constă din lanţuri polipeptidice, avînd o structură unitară sau diversificată. Compuşii proteici au o afinitate deosebită pentru receptorii celulari şi reprezintă determinanţii antigenici ai virusurilor. Au greutatea moleculară suficient de mare (10 000 pînă la peste 100 000), răspunzînd şi din acest punct de vedere la criteriile de bază ale imunogenicităţii. Peplomerele virale constau din subunităţi repetate de 1—2 glicoproteine. Hidraţii de carbon şi lipidele fac parte din structura învelişului viral şi au origine celulară.

Capsida, învelişul proteic al virusurilor, este formată din moleculele proteice avînd trei nivele de organizare:

— unităţile chimice — formate din polipeptide, legate prin punţi disulfidice şi prin legături covalente;

— unităţile structurale — polimeri formaţi din mai multe polipeptide;

Scanned with OKEN Scanner

— unităţi morfologice, reprezentate de unităţile structurale sau grupe ale acestora, aşa cum sînt observate la microscopul electronic, denumite şi capsomere.

Analiza structurii deosebit de complexe a virusurilor permite să se înţeleagă că aceasta le asigură atît imunogenitatea cît şi antigenitatea.

Studiul unor virusuri patogene a permis izolarea şi identificarea unor componente importante din punct de vedere al activităţilor biologice virale.

Astfel, Cox şi col. (1977) au purificat glicoproteina virusului rabic, liberă de lipide şi de alte proteine. Compusul induce formarea anticorpilor neutralizanţi precum şi a celor protectori, fiind considerată de unii autori ca reprezentînd vaccinul antirabic uman ideal. Un al doilea antigen al virusului rabic, cel specific de grup (N) a fost izolat de Schneider şi col. (1973).

Virusul leucozei enzootice bovine conţine cel puţin 17 polipeptide, dintre care două includ în componenţa lor şi glucide. Cele mai importante (şi cercetate) dintre acestea sînt: p 24, cu greutatea moleculară de 24 000 daltoni (Deshayes şi col 1977, Gilden şi col. 1975), care ocupă o poziţie internă în virion şi este rezistentă la eter; gp 60, cu greutate moleculară diferită de la un autor la altul (Deshayes şi col. 1977, Onuma şi col. 1976 şi alţii), este izolată din supernatantul culturilor producătoare de virus. Mussgay şi col. (1977) au izolat proteina p 15, cu proprietăţi precipitante; reacţionează încrucişat cu antiseruri provenite de la oi şi bovine cu leucoză (Kaaden şi col. 1977). Prin electroforeză în gel de poliacrilamidă au fost evidenţiate 8 antigene ale virusului leucozei bovine, cu greutăţi moleculare de la 11 000 la 80 000; dintre acestea, antigenele gp 60, p 35, p 24 şi p 16 pot servi la decelarea anticorpilor specifici prin testul de fixare a complementului (Deshayes, 1977).

Glicoperoteinele HN şi F ale virusului Sendai au proprietăţi imunogenice distincte, inducînd sinteza unor anticorpi diferiţi care pot fi identificaţi prin teste serologice (Orvell şi Norrby, 1977).

Antigenele bacteriene sînt reprezentate de substanţele chimice cu un grad suficient de ridicat de complexitate, prezente în corpul bacterian sau secretate de bacterii.

Antigene avînd un rol evident în patogeneza infecţiilor bacteriene, în imunoprofilaxia dirijată şi în diagnosticul imunologic, sînt şi toxinele bacteriene.

Substanţele toxice eliberate de bacterii sînt proteine, fapt demonstrat prin păstrarea proprietăţilor toxice de către compuşii purificaţi aparţinînd acestei clase, obţinuţi din toxine. Structura lor este extrem de variabilă; astfel, greutatea moleculară variază între 67 000 în cazul toxinei tetanice şi 1 000 000 la toxina botulinică. Factorii fizici (căldura) sau chimici (formolul, acizii minerali, enzimele proteolitice) inactivează toxinele bacteriene. Aceste proprietăţi sînt folosite pentru realizarea unor vaccinuri; procesul de preparare a acestora urmăreşte anularea toxicităţii şi păstrarea unui număr suficient de determinanţi antigenici care să asigure inducerea unui răspuns imunologic specific.

Dintre acestea sînt bine cunoscute în primul rînd *exotoxinele clostridiene*; astfel, la *Clostridium perfringens* sînt descrise toxinele: alfa (letală pentru şoarece, dermonecrozantă, hemolitică), beta (termolabilă, letală şi dermonecrotică), gamma (letală dar nehemolitică), delta (hemolitică), epsilon (letală, necrozantă, termostabilă); au fost descrise, la germenii din specia *Cl. perfringens*, cel puţin 10 toxine diverse. La *Cl. oedematiens* au fost evidenţiate 6 toxine avînd proprietăţi diversificate, dermonecrozante, hemolitice, letale; *Cl. septicum* elaborează două componente toxice, dintre care una letală şi cealaltă hemotoxică. Carac-

Scanned with OKEN Scanner

terele structurale ale toxinelor clostridiene determină ca aceşti compuşi să fie antigene cu un grad ridicat de imunogenitate. Ca urmare, anatoxinele clostridiilor sînt larg folosite în practica imunoprofilaxiei bolilor respective.

Toxinele bacilului cărbunos constau din trei componente. Compuşii I şi II produc edem şi letalitate; factorul II este netoxic dar are un rol major în inducerea imunizării. Factorul III este toxic. În componenţa factorilor I şi II, intră acizi aminaţi şi glucide, factorul III fiind constituit din polipeptide, glucide şi lipide.

Patogenitatea unor germeni este condiţionată de prezenţa şi acţiunea unor molecule, în general proteinolipopolizaharidice, cunoscute ca făcînd parte din grupa *endotoxinelor*. Acestea sînt incluse în special în peretele bacteriilor, unele polizaharide fiind evidenţiate în capsula bacteriană. Lipopolizaharidele constau din trei regiuni principale: lanţul specific O, polizaharidul şi lipida A; ultima dintre aceste regiuni pare să fie identică la toate microorganismele cercetate pînă în prezent, ea contribuind la realizarea legăturii dintre antigenul complet şi membrana celulară.

Fracţiunea lipidică A participă, după, unii autori, şi la activitatea toxică a compusului şi la provocarea reacţiilor nespecifice ale endotoxinei. Această fracţiune poate deveni imunogenică numai în urma inocularii în condiţii speciale (prin complexe cu bacterii Gram negative). Este compusă din glucozamină, acizi graşi şi fosfat, fiind deci în fond o glicofosfolipidă, cu structură similară la toate enterobacteriile.

Imunogenicitatea polizaharidelor depinde de o serie de factori ca dimensiunile moleculei, cuplarea cu „purtători" proteici, rezistenţa la enzime ca şi de specia, vîrsta şi elementele de control genetic ale animalului primitor. În legătură cu greutatea moleculară, datele obţinute pînă în prezent sînt într-o bună măsură contradictorii; greutatea moleculară minimă necesară pentru ca o substanţă polizaharidică să fie antigenică pare să fie 10 000—20 000.

În legătură cu mecanismele prin care se realizează răspunsul imun faţă de polizaharide, este remarcabilă constatarea conform căreia aceste antigene nu implică participarea limfocitelor T, ca etapă intermediară înainte de activarea limfocitelor B (cele care, printr-un proces de diferenţiere sintetizează anticorpii) (Andersson şi col., 1972, Manning şi col. 1972, Coutinho şi Möller 1974). Aşa este cazul polizaharidelor pneumococice, al lipopolizaharidelor colibacteriene şi al flagelinei purificate izolate din unele specii de *Salmonella*. Proprietăţi asemănătoare au complexele antigen-anticorp precum şi antigenele celulare de membrană. Toate aceste antigene induc în special sinteza imunoglobulinelor M şi sînt cunoscute ca *antigene timus-independente*.

Spre deosebire de aceste substanţe, antigenele *timus-dependente* nu au capacitatea de a stimula direct limfocitele B, afinitatea lor pentru receptorii acestor celule fiind prea redusă. În schimb, antigenele timus-dependente se pot fixa la membranele macrofagelor sau limfocitelor T. La rîndul lor, limfocitele de tip B realizează, contacte cu celulele T, în urma căreia acestea prezintă antigenul şi stimulează iniţierea biosintezei. Exemple de antigene timus-dependente sînt colifagii T, albumina serică bovină, imunoglobulinele, antigenele salmonelice O şi Vi.

Mucopolizaharidele sînt substanţe antigenice prezente în pereţii celulari ai unor bacterii (pneumococi, *Haemophilus*, streptococi etc.).

În cadrul structurii antigenice a enterobacteriaceelor (fig. 2) se întîlnesc trei categorii de antigene:

— antigenul somatic termostabil O, corespunzător antigenului de tip Boivin, constituit din punct de vedere chimic din complexe glucidolipidopolipeptidice; în urma inocularii la

Scanned with OKEN Scanner

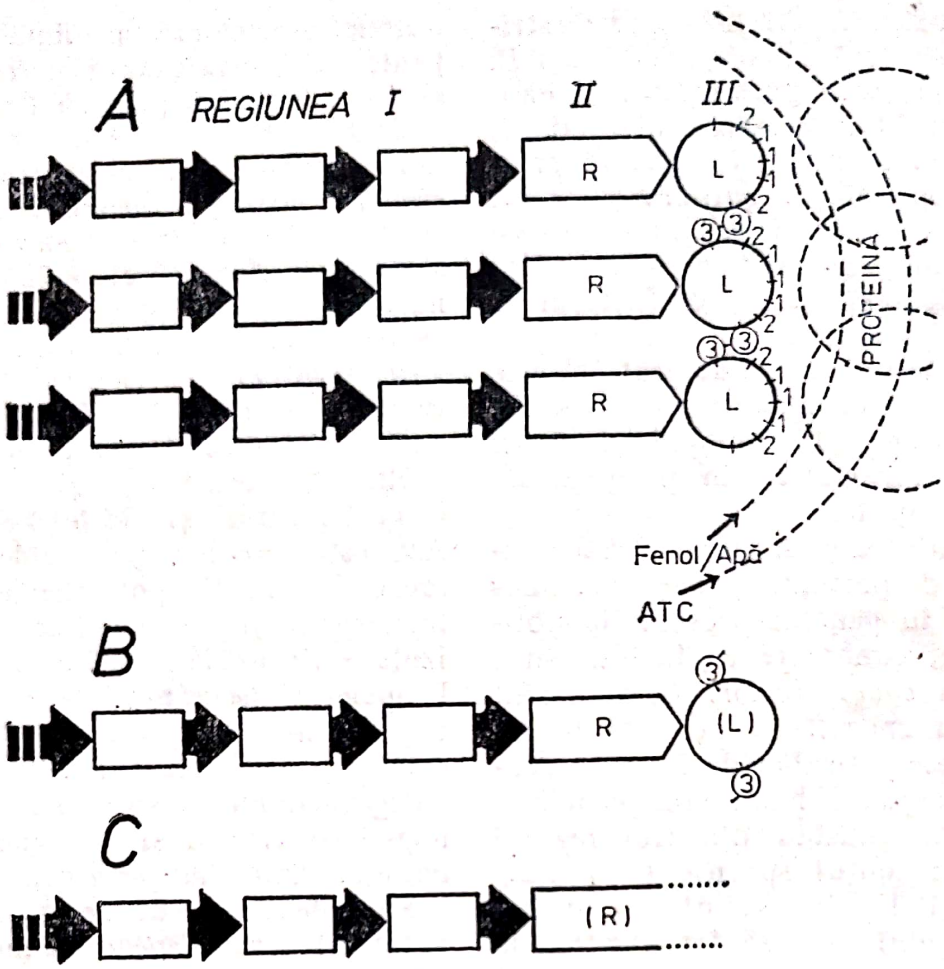


Fig. 2 — Extract de *Enterobacteriaceae*

I *A*— antigen *O* complet; *B* — lanț de lipopolizaharid; *C* — polizaharid degradat; *L* — lipida *A*; *1* — lanț de acid gras; *2* — grupări hidroxi-miristoil. Se observă unitățile oligozaharidice în cadrul fiecărui lanț (după J a n n și W e s t p h a l)

animale de experiență produce, în funcție de doză și de reactivitatea primitorului, formarea anticorpilor, stimularea fagocitozei, fenomene de tip Schwartzman, modificări ale formulei leucocitare, avînd, în unele condiții efecte letale;

— antigenul H (flagelar, ciliar), termolabil, constituit din proteine;

— antigenul K, termolabil, capsular, constituit în special din polizaharide; antigenul K 88, descris la colibacili și responsabil pentru virulența acestora, este proteic.

Pe lîngă aceste antigene principale, la unele specii de *Salmonella* sînt prezente în capsulă antigenele Vi.

O serie de cercetări au aprofundat structura antigenică a *speciilor din genul Pasteurella*. Astfel, P e n n și N a g y (1974), aplicînd tehnicile de imunodifuziune și imunoelectroforeză au examinat extractele saline și fenolice de *Pasteurella multocida* stabilind că antigenul specific pentru tipurile B și E este capsular și că endotoxinele celor două tipuri nu au specificitate. După primele semnalări ale lui C a r t e r, P e n n și N a g y (1974) constată că antigenul capsular este cel implicat în protecția antipasteurelică. M u k k u r (1978) obține un extract din *Pasteurella multocida* și *P. haemolytica* cu ajutorul tiocianatului de potasiu care induce formarea anticorpilor aglutinanți, hemaglutinanți, bactericizi, sensibilizanți și protectori. O fracțiune imunogenă proteino-polizaharidică a fost obținută din tulpini de *P. multocida* de către G a n f i e l d

și col. (1976); compusul a indus imunizarea activă la șoarece și curcă. Pe de altă parte, Thompson și Mould (1975) evidențiază antigenele proteice ale *P. haemolytica* prin electroforeză în gel de poliacrilamidă, metodă care poate contribui la clasificarea germenilor din această specie ca și din altele.

Micobacteriile au făcut obiectul a numeroase cercetări în legătură cu structura lor antigenică. Rezultatele obținute, în urma aplicării unor metode biochimice, imunochimice și serologice, atestă structura complexă a acestor germeni.

Antigenele puse în evidență prin teste de aglutinare fac parte din structura peretelui celular, fiind dependente în primul rînd de prezența compusului D-arabino-D-galactan, principalul polizaharid al micobacteriilor; acesta este responsabil de reacțiile încrucișate între micobacterii și germeni din genurile *Nocardia* și *Corynebacterium* (Misaki și col., 1974). Imaeda și col. (1968) consideră că peretele celular al micobacteriilor este format din două straturi, unul constituit dintr-un lipopolizaharid bogat în glucoză, al doilea incluzînd un alt lipopolizaharid bogat în arabinogalactan. Filamentele din peretele celular sînt compuse din peptidoglicolipide, micozida C la *M. avium* (White, 1965; Draper, 1974).

Prin tehnicile de hemaglutinare sînt evidențiate două antigene: polizaharidice decelate prin varianta Middlebrook — Dubos) și proteice (în varianta Boyden-Sorkin). Ulterior, s-a demonstrat corelația dintre ceara D și antigenele care intervin în testul de hemaglutinare.

Testul de fixare a complementului, mai puțin util în studiile referitoare la structura antigenică, evidențiază prezența unor dimanozide. Folosind extracte fenolice de micobacterii, Tacquet și col. (1970) au aplicat RFC pentru diferențierea serologică a acestora.

Prin imunodifuziune și imunoelectroforeză au fost obținute cele mai semnificative indicii cu privire la structura antigenică a micobacteriilor și în legătură cu diferențierea lor serologică. Antigenele evidențiate prin aceste metode fac parte din componența citoplasmei și a membranei celulare. Tehnica de imunodifuziune a fost aplicată pentru cercetările taxonomice cu privire la micobacterii (Lind, 1960; Stanford, 1973; Norlin, 1965; Ridell și Norlin, 1973). Acești autori au demonstrat existența unor antigene comune și a antigenelor specifice de gen și specie. Stavri și col. (1979) au folosit contra-curent imunoelectroforeza preparativă pentru izolarea antigenelor specifice de *Mycobacterium tuberculosis*, eliminînd în același timp antigenele comune cu tulpina BCG de *M. bovis*; autorii au constatat că antigenele specifice astfel preparate pun în evidență numai hipersensibilizarea indusă de *M. tuberculosis*. O serie de autori (Goodfellow și col., 1974; Kubica și col., 1972; Meissner și col., 1974) au stabilit existența unei corelații între rezultatele testelor de precipitare și proprietățile evidențiate prin teste bacteriologice și fiziologice. Numărul de antigene decelate prin tehnici de precipitare este foarte mare după unii autori: 40 antigene la *M. simiae* și *M. habana* (Thorel, 1976) și chiar 60 la *M. tuberculosis* (Roberts și col., 1972)

Vior și col. (1971) au cercetat antigenele comune și specifice la micobacterii din 8 specii, constatînd că folosirea unor sisteme de referință și a raporturilor de corelație antigenică permite stabilirea structurii antigenice a acestor germeni.

Cord — factor, un compus caracteristic micobacteriilor, este un dimicolat de trehaloză cu activitate imunostimulantă (Lederer, 1978).

Antigenele tisulare și celulare sînt reprezentate de compuși cu structură extrem de variată în funcție de specie, organ (țesut), părți ale organelor etc.

Scanned with OKEN Scanner

Substanţele implicate în edificarea acestor antigene sînt proteine, glucide, lipide şi compuşi ai acestora, incluzînd atît proteine purtătoare cît şi haptene care conferă specificitatea antigenică.

Compuşii macromoleculari şi haptenele sînt părţi constitutive ale membranelor celulare şi sînt dotate cu calităţi imunogenice şi antigenice în cazurile în care sînt respectate condiţiile de non self, stabilitate, dimensiune, structură etc. Spre deosebire de antigenele solubile, antigenele celulare se evidenţiază cu mai multă uşurinţă dar se izolează mai greu; în acelaşi timp, pentru cercetarea acestor antigene sînt folosite metode diferite de cele aplicate pentru studiul antigenelor solubile.

Evidenţierea antigenelor celulare şi tisulare, a antigenelor de organ, a permis realizarea unor progrese în diagnosticul unor stări patologice.

În acest cadru sînt incluse, în primul rînd, antigenele grupelor sanguine, cele de histocompatibilitate şi, studiate în mai mică măsură, antigenele tumorale şi cele ale membranelor bazale.

Prin folosirea antigenelor tisulare şi a serurilor contra acestora se pot obţine informaţii cu privire la specia de animal căreia îi aparţine un organ sau un ţesut. Andersen (1975) a preparat astfel de antigene termostabile, insolubile în alcool etilic din splină şi rinichi de la mai multe specii de rumegătoare, constatînd că serurile preparate pe capre sînt superioare celor obţinute prin inocularea iepurilor.

Antigenele grupelor sanguine sînt constituite din compuşii chimici participanţi la realizarea structurii deosebite de complexe a eritrocitelor. Aceste antigene sînt structuri genetic dependente care definesc individualitatea suprafeţelor celulare, lichidelor biologice şi secreţiilor. Decelarea substanţelor hidrosolubile, antigenic similare cu antigenii eritrocitari, a permis studierea acestora. S-a constatat astfel că este vorba de glicoproteine cu greutate moleculară mare (1 000 000), constituite din zaharuri simple şi aminoacizi.

La om, antigenele H (de la indivizi din grupa 0), A şi B (de la indivizi din grupele A, B şi AB) au fost izolate în forme purificate. S-a constatat că există importante înrudiri antigenice între aceste componente. Astfel, componentul A poate fi scindat în substanţa H şi N-acetilgalactozamină; antigenul B este scindat în H şi galactoză iar componentul H poate fi purificat pînă la o moleculă similară cu sistemul sanguin Lewis.

În afara antigenelor A, B, H şi Lewis, au mai fost decelaţi antigenele MN, P, J, Rh etc.

Enzimele şi hormonii sînt, din punct de vedere imunologic, substanţe antigenice, dotate cu capacitatea de a induce biosinteza anticorpilor şi de a reacţiona cu aceştia. Ca atare, enzimele au fost folosite în numeroase cercetări de imunobiologie, fapt explicat prin unele avantaje faţă de alţi compuşi antigenici. De exemplu, la multe specii există enzime cu funcţii similare, fapt care este de un real folos în studiile privind filogenia proteinelor. Prin cercetări în cadrul cărora au fost aplicate metode imunologice, au fost lămurite aspecte privind corelaţia structură-funcţie; în cadrul modelelor experimentale respective au fost folosite enzime. Pe de altă parte, aplicarea metodelor imunologice a permis cunoaşterea mai aprofundată a funcţiunilor unor enzime.

Prin utilizarea metodelor imunochimice (între care analiza şi definirea unor fragmente obţinute prin digestie proteolitică) a fost constatată prezenţa determinanţilor antigenici la enzime. Astfel, la lizozimul de albuş de ou au fost decelate două fragmente active imunologic, avînd dimensiuni destul de mari şi conţinînd probabil mai mult decît cîte un singur determinant antigenic. Zonele active au fost puse în evidenţă şi în cazul altor enzime ca nucleaza stafilococică (Sachs şi

Scanned with OKEN Scanner

col., 1972), chemotripsina şi tripsina bovină (Arnon şi Schechter, 1966), ribonuclează (Isagholian şi Brown, 1970) etc.

La rîndul lor, hormonii sînt dotaţi cu proprietăţi imunogenice, mai ales în cazul asocierii cu adjuvant Freund. Aşa este cazul insulinei (ale cărei diferenţe de structură chimică sînt minime la diferite specii), ACTH etc. Cuantificarea hormonilor se realizează în condiţii superioare printr-o metodă imunologică — radioimunodozarea.

Antigenele de histocompatibilitate (AgH) sînt reprezentate de structuri ale suprafeţelor celulare, genetic determinate, diferite la indivizii aparţinînd aceleiaşi specii. Existenţa lor a fost şi este demonstrată prin eliminarea imună a grefelor în cazurile în care donatorul şi primitorul prezintă diferenţe antigenice din acest punct de vedere.

Primii AgH au fost descrişi la şoareci; este vorba de antigenele proprii pentru patru grupe sanguine, dintre care una a fost decelată şi în ţesuturi, afectînd realizarea transplantelor de tumori.

Este recunoscut rolul factorilor genetici în determinarea modului de comportare a organismului primitor faţă de transplant. În acest sens s-a ajuns la concluzia că fiecare specie are un singur locus de histocompatibilitate.

La cîine, au fost identificate cel puţin 6 sisteme antigenice tisulare. Principalul sistem DL-A, este foarte polimorf şi este reprezentat de două grupe de celule multiple.

La porc, existenţa locusului de histocompatibilitate are un rol esenţial în eliminarea allogrefelor cutanate şi renale.

Alloantigenele de histocompatibilitate sînt prezente, în diferite proporţii, în numeroase ţesuturi.

AgH se menţin în culturi celulare perioade lungi de timp, în timp ce alţe antigene dispar la diferite intervale de timp.

Antigenele de histocompatibilitate modifică în unele situaţii receptivitatea faţă de boli. Astfel, ele pot prezenta receptorii specifici pentru fixarea unor virusuri. AgH pot avea determinanţi antigenici comuni cu virusurile şi bacteriile. În aceste cazuri, organismul gazdă nu mai reacţionează la intensitatea necesară faţă de agresiunea unor germeni care au astfel de proprietăţi antigenice.

III. 6. Metode de preparare şi studiu al antigenelor

Cercetările cu privire la compoziţia chimică, rolul şi funcţiile antigenelor, implică purificarea acestora şi, în continuare, obţinerea diverselor fragmente. Datele de literatură existente pînă în prezent, parţial expuse în continuare, atestă progresele realizate în acest domeniu, aportul practic adus de cunoaşterea aprofundată a structurii şi a modului de participare a antigenelor la iniţierea şi evoluţia complexelor procese imunitare.

Metodele cele mai utilizate în scopul purificării diverselor antigene şi al studiului proprietăţilor acestora includ:

— *metode fizice*: cristalizarea, electroforeza, izotachoforeza preparativă, gelfiltrarea (fig. 3), cromatografia, cromatografia de afinitate, ultracentrifugarea, liza celulelor (bacterii sau ţesuturi organice), ultrasonarea, congelările — decongelările repetate, presiunile ridicate, dializa de echilibrare (fig. 4) etc.;

— *metode chimice*: tratarea cu acizi, alcooli sau baze, extracţii prin tratamente enzimatice etc.;

Scanned with OKEN Scanner

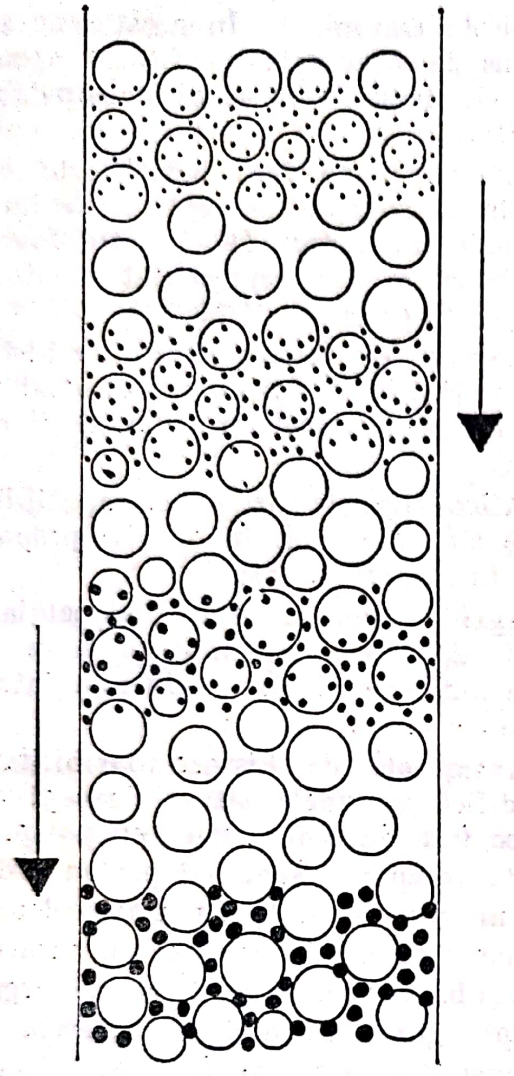


Fig. 3 — Gelfiltrare pe coloane cu dextrani. Separarea fracţiunilor pe baza greutăţilor moleculare

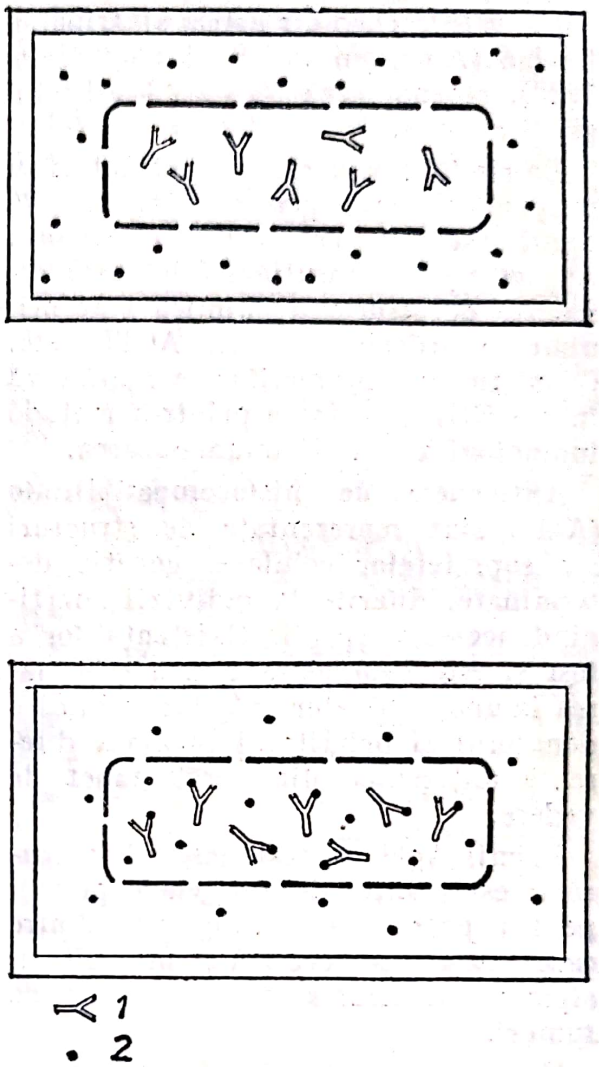


Fig. 4 — Reprezentarea dializei de echilibrare: distribuţia moleculelor de imunoglobuline (1) şi antigen (2) înainte şi după stabilirea echilibrului

— *metode biologice*: liza bacteriofagică, autoliza culturilor bacteriene etc.

În cele mai multe situaţii, izolarea şi purificarea antigenelor bacteriene, virale, tisulare, helmintice şi a altora impune aplicarea succesivă a mai multor procedee tehnice.

Scanned with OKEN Scanner

IV Răspunsul imun (imunogeneza)

Răspunsul imun sau imunogeneza este reacţia organismului prin care acesta produce efectori imuni consecutiv unui stimul antigenic. Prima condiţie a dezvoltării unui răspuns imun este recunoaşterea non selfului. Ca şi în cazul imunităţii naturale, organismul acţionează în sensul distrugerii, al îndepărtării sau al anihilării efectelor nocive ale non selfului. În timp ce mecanismele imunităţii naturale acţionează însă în mod egal, nediferenţiat împotriva non selfului, indiferent de compoziţia lui chimică şi indiferent dacă acesta are sau nu proprietăţi antigenice, răspunsul imun are loc numai faţă de structuri non self dotate cu atributele antigenităţii şi se caracterizează printr-un înalt grad de specificitate.

În cazul răspunsului imun organismul elaborează efectori imuni reprezentaţi de structuri de neoformaţie, inexistente anterior pătrunderii antigenului. Acestea pot fi, ca nivel de organizare, molecule sau celule.

Efectorii imuni cu nivel de organizare molecular se numesc anticorpi, denumirea subliniind complementaritatea lor faţă de antigen, sau imunoglobuline, termen mai modern care precizează compoziţia chimică corelată cu intervenţia lor în procesele imune.

Efectorii imuni cu nivel de organizare celular poartă denumiri diferite, în funcţie de natura celulelor efectoare, de modul lor de formare şi de acţiune.

Starea de imunitate instalată pe baza răspunsului imun poate fi considerată ca fiind de tip umoral sau celular, în funcţie de predominanţa uneia din cele două categorii de efectori imuni; împărţirea aceasta este arbitrară întrucît şi efectorii imunităţii umorale sînt de fapt tot rezultatul unor activităţi celulare.

Trăsătura esenţială a răspunsului imun constă în faptul că atît în recunoaşterea non selfului, cît şi în procesul de elaborare al efectorilor imuni, organismul reuşeşte să diferenţieze detalii fizico-chimice de extremă fineţe ale antigenului şi să determine negativul acestora sub forma unor complementarităţi de o extrem de riguroasă specificitate. Capacitatea de discernere şi diferenţiere a detaliului de către organism este elocvent demonstrată de exemplul clasic în care, în elaborarea anticorpilor specifici unor antigene artificiale preparate prin cuplarea unei proteine cu acid tartric, gradul de specificitate al anticorpilor merge pînă la sesizarea tipului de rotaţie al luminii polarizate. Astfel, anticorpii a căror formare este determinată de antigenul ce conţine acid tartric dextrogir nu reacţionează decît

Scanned with OKEN Scanner

cu acest antigen şi sînt incapabili să reacţioneze cu antigenul în care gruparea determinantă este reprezentată de acidul tartric levogir şi invers.

Producerea efectorilor imuni este determinată de acea însuşire a unor sisteme morfofuncţionale ale organismului numită imunocompetenţă.

Într-un sens mai larg, imunocompetenţa este atribuită tuturor organelor, ţesuturilor, celulelor, care contribuie într-un fel sau altul la realizarea răspunsului imun.

Într-un sens mai îngust, imunocompetenţa este recunoscută numai elementelor morfofuncţionale care produc prin biosinteză sau din care rezultă prin transformare blastică efectori imuni.

Într-o concepţie mai modernă, inspirată din lucrările imunologului Victor Gheţie, imunocompetenţa ar putea fi definită ca însuşirea unor celule din organism de a recunoaşte cu ajutorul receptorilor imunologici de pe suprafaţa lor semnalele antigenice, de a le traduce şi amplifica intracelular, determinînd celula să producă efectori imuni sau să îndeplinească ea însăşi acest rol.

Treapta filogenetică la nivelul căreia apare imunocompetenţa o reprezintă vertebratele. Peştii sînt prin urmare vieţuitoarele cele mai puţin evoluate, capabile să dezvolte un răspuns imun. Suind pe scara filogenetică, se constată o strînsă corelaţie între superioritatea treptei şi complexitatea răspunsului imun.

IV. 1. Sistemul celular al imunităţii (S.C.I.)

Sistemul celular al imunităţii are origine mezenchimală, reprezentînd unul dintre cele mai active ţesuturi ale organismului animal. Reactivitatea acestui sistem şi plasticitatea sa nu au egal în nici un alt ţesut din organism; pe cît de heterogenă este originea celulelor competente, pe atît de unitară este organizarea defensivei macroorganismului faţă de diferite antigene (virusuri, bacterii, fungi, paraziţi, antigene, solubile, autoantigene) prin efectorii imuni. Răspîndirea teritorială a acestui sistem este foarte largă, toate viscerele şi organele avînd o componentă S.C.I. încadrată în structura organică sau situată în imediata vecinătate a unor parenchime sau viscere (Eskenasy 1972; Simu 1978; Harrison, 1974).

Sistemele morfofuncţionale imunocompetente sînt reprezentate de organe, ţesuturi şi celule care intră în dispozitiv în diferite stadii ale dezvoltării ontogenetice. Organele, în funcţie de ponderea lor în producerea celulelor imunocompetente şi mai ales de etapa de dezvoltare a organismului în care acţionează, se împart în organe primare sau centrale şi organe secundare sau periferice (foto IV.1).

IV. 1.1. Organele imunocompetente primare (centrale)

Organele imunocompetente primare sînt acele organe în care limfocitul, macrofagul şi celelalte celule implicate în realizarea răspunsului imunologic se formează şi se definesc ca celule şi devin active în urma unor fenomene de maturare şi citodiferenţiere care au loc în cursul dezvoltării embrionare. Ele sînt măduva osoasă, timusul, bursa lui Fabricius sau echivalenţii acesteia, precum şi amigdalele palatine împreună cu cercul limfoid Waldayer. Măduva este ţesutul producător al celulelor de origine în timp ce în timus şi bursă au loc maturarea şi citodiferenţierea. Din punct de vedere morfolo-

Scanned with OKEN Scanner

gic elementul caracteristic şi comun al organelor primare îl constituie structura de tip limfoepitelial, fără a se putea identifica pe preparatele histologice formaţiuni foliculare şi centri germinativi (Brunn, 1974; Popescu, 1971; Semenor şi col., 1977).

Măduva osoasă (măduva hematoformatoare) este sediul genezei celulei de origine, un strămoş comun al limfocitelor, macrofagelor şi al altor celule de origine mezenchimală. Această celulă mamă sau celulă suşă, multipotenţială, pentru care cel mai des se utilizează termenul „stem", apare într-o fază foarte timpurie a dezvoltării embrionare. În afară de măduvă, celule limfoide precursoare se mai formează în ficatul embrionar şi în sacul vitelin la păsări. Celulele de acest tip migrează din măduvă în alte organe limfoide primare şi anume în timus şi bursa lui Fabricius (sau echivalenţii acesteia la mamifere), unde au loc procesele de citodiferenţiere şi maturare. În afara rolului de organ hematoformator primar, măduva osoasă constituie un depozit permanent de celule imunocompetente pe tot timpul vieţii.

Măduva hematoformatorie este formată dintr-o stromă constituită din elemente reticulohistiocitare şi un ţesut nobil reprezentat de ţesutul hematopoetic. Capsula acestui ţesut este însăşi endostul foarte bogat în fibre reticulinice şi colagenice, avînd o extrem de rară celularitate. Elementele constituente de tip stromal sînt fixe şi au aspectul de sinciţii celulare. Anastomozarea elementelor reticulare fixe creează veritabile ochiuri care alcătuiesc insulele de hematopoeză, elementele nobile ale acestui ţesut. În afară de această configuraţie se remarcă şi alt element de structură, extrem de important şi anume capilarele sinusoide care au un strîns raport morfofuncţional cu insulele de hematopoeză. Fenomenul de deversare continuă a elementelor hematopoezei medulare în circulaţia sanguină, denumită diabază, se realizează graţie prezenţei elementelor maturate în apropierea sinusoidelor. Elementele blastice ale seriilor celulare se găsesc la o depărtare considerabilă de sinusoidele medulare.

Timusul prezintă o capsulă care adăposteşte parenchimul timic compus dintr-o zonă dens populată cu celule limfocitare de tip „T" (timocite) dispuse nesistematizat şi cu o cantitate redusă de stromă, aceasta fiind zona corticală. Corticala timică se continuă cu zona medulară, caracterizată prin dominarea ţesutului de susţinere (conjunctiv); ea conţine o cantitate mult mai redusă de celule limfocitare „T", elementul care caracterizează organul fiind corpusculul Hassal de natură reticulo-epitelială (Astaldi şi col., 1973; Bessis, 1973) (foto IV. 5).

Timusul este populat cu celule „stem" imediat după constituirea sa ca organ din pungile brahiale III şi IV. Celulele limfoide se localizează de obicei sub formă de pachete în spaţiile dintre celulele epiteliale reticulare, constituente ale medularei lobulilor timici.

În timus, celulele limfoide precursoare, sub acţiunea inductoare a unui factor difuzibil limfoido-diferenţiator, numit şi „factor timic", timozină sau timpoetină, se transformă în limfocite. Acestea suferă un proces de maturare şi rămîn cantonate la nivelul timusului pînă într-o fază a ontogenezei situată fie în ultima fază a evoluţiei embrionare, fie imediat după naştere, cînd limfocitele vor migra din timus în organele limfoide secundare. În timpul migrării, limfocitele îşi desăvîrşesc procesul de maturare sub acţiunea inductoare a unor factori extratimici. Experimental, Sunshine şi col. (1978) au demonstrat că timopoetina purificată poate acţiona stimulativ, chiar în concentraţii foarte mici şi asupra populaţiilor de limfocite posttimice de la nivelul ganglionilor limfatici şi splinei. Maturarea implică şi o

Scanned with OKEN Scanner

serie de variații genetice, mai ales mutații, prin care se diversifică clonele de celule imunocompetente în funcție de antigenele existente în natură pentru specia animală respectivă. Limfocitele diferențiate și maturate la nivelul timusului sînt numite curent limfocite T (de origine timică sau timus dependente). În urma contactului cu antigenul, limfocitele T se vor transforma în limfocite specific sensibilizate, respectiv efectorii imunității mediată celular. În afară de imunitatea celulară, limfocitele T au și un important rol în elaborarea răspunsului imun de tip umoral (M e t c a l f, 1966).

Bursa lui Fabricius este un organ prezent numai la păsări, cu structura lobulară asemănătoare cu timusul. Stroma epitelială a bursei este populată cu celule limfoide precursoare provenind din sacul vitelin, ficatul fetal și măduva osoasă. La nivelul bursei, celula mamă multipotențială suferă un proces de citodiferențiere și maturare analog celui care are loc la nivelul timusului, dar care conferă limfocitelor însușiri calitativ deosebite de cele ale limfocitelor T. Ubicvitina este un factor umoral citodiferențiator, analog timopoetinei, care acționează în acest caz asupra limfocitelor. Această categorie de limfocite sînt notate cu simbolul B (de la Bone marow=măduva osoasă). După migrarea lor în organele limfoide secundare, concomitent cu limfocitele T, ele devin capabile să reacționeze la stimulul antigenic prin transformări blastice în urma cărora se transformă în plasmocite și devin producătoare de imunoglobuline (anticorpi), adică efectori ai imunității umorale. La mamifere, care sînt lipsite de bursa lui Fabricius, funcția acesteia este suplinită de alte organe limfoide, mai ales de plăcile Payer, considerate ca „echivalenți ai bursei" (C a r r, 1967) (foto IV. 6).

IV. 1.2. Organele imunocompetente secundare (periferice)

În această categorie intră toate lanțurile limfoganglionare, splina și teritoriile limfoide libere. Elementele histologice care le caracterizează sînt legate de prezența centrilor germinativi. Aceste organe sînt numai parțial dezvoltate în viața intrauterină, ele rămînînd să-și continue dezvoltarea ulterior, fenomen care nu este constatat în cazul organelor imunocompetente centrale care sînt la naștere complet dezvoltate.

Organele limfoide secundare sînt acele organe care se populează cu limfocitele imunocompetente provenind din timus și bursă sau echivalenții ei. Transferul inițial al celulelor imunocompetente din organele primare către cele secundare este situat, în funcție de specia animală, fie în ultima perioadă a dezvoltării embrionare, fie imediat după naștere. Întrucît organismul devine acum capabil să dezvoltate un răspuns imun complet, acest moment al ontogenezei este numit „maturare imunologică" (G r a y, 1966; P o l i c a r d și B e s s i s, 1968).

Limfoganglionii au o structură histologică specifică. Spre exterior prezintă *capsula ganglionară* compusă din fibre colagenice și precolagenice; o parte din aceste fibre pătrund la interior delimitînd zone de parenchim limfoganglionar.

Parenchimul ganglionar, format din celule limfoide dense, capilare sinusoidale limfatice, artere limfoganglionare, este compus dintr-o zonă *medulară* sub formă de cordoane și o zonă *corticală*. Aceste structuri includ: *zona foliculară* cu aspect medular, formată din limfocite de tip „B" și *zona paracorticală* constituită din limfocite de tip „T". Diferențierea între aceste două regiuni se realizează pe baza prezenței centrilor

Scanned with OKEN Scanner

germinativi în zona foliculară și a absenței acestora în cea paracorticală.

Stroma este constituită din celule reticulo-histiocitare și o rețea anastomozată de fibre de reticulină.

Sinusul subcapsular este de aspect tubular și delimitează parenchimul de capsulă.

În ganglioni, are loc în cea mai mare parte transmiterea informației antigenice de la macrofage către limfocite, urmată de transformările blastice prin care acestea trec în timpul prelucrării informației antigenice. Se constată existența unei relații directe între gradul de dezvoltare a centrilor germinativi și intensitatea stimulului antigenic (foto IV.2).

Splina prezintă spre exterior *capsula* care este un omogenizat de fibre colagenice, elastice și musculare netede. Aceasta trimite spre interior o serie de travee care împart parenchimul splenic într-o serie de loji.

Stroma este compusă din două componente și anume: una reticulară și alta conjunctivo-vasculară.

Parenchimul are două sectoare bine individualizate. Unul este format din lacune vasculare dispuse cordonal. Această structură de tip „sinusal" este compusă, din punct de vedere celular, din limfocite, plasmocite, macrofage, celule reticulare fixe, hematii și granulocite neutrofile. Aceste structuri formează și delimitează așa-numita „pulpă roșie". O altă formațiune a parenchimului este „pulpa albă" reprezentată de ramificațiile sistemului vascular arterial central, iar de jur împrejur sînt dispuse cu o mare densitate celule din seria limfoidă. Acestea sînt repartizate sub formă de noduli (corpusculii Malpighi), constituiți de către celulele limfocitare „B" și manșoane perivascular-arteriale, constituite de către celulele limfocitare „T" (foto IV.3, 4).

Alte organe sau țesuturi limfoide secundare care adăpostesc limfocitele care intervin în răspunsul imun sînt amigdalele împreună cu celelalte componente ale inelului lui Waldeyer, plăcile lui Peyer și, în general, insulele de țesut limfoid diseminate în restul organismului (M a n o l e s c u și col., 1978).

Țesuturile limfoide periferice diseminate sînt răspîndite în cele mai diverse locuri din organism cum ar fi faringele, tractusul respirator inclusiv zona parabronhică, tractusul digestiv (zonele submucoase), dermul etc. Aceste țesuturi nu recunosc structuri bine delimitate și nici nu au aspectul limfoganglionilor sau al splinei. Sînt formate din celule reticulare de tip germinoblastic, limfoblești, limfocite atît „B" cît și „T" iar în cazurile de reacție față de diferite antigene apar elemente blastice de tip limfoplasmocitar cu diferențiere plasmocitară. În unele situații, în reacția acestor teritorii se pot distinge și elemente mieloide ca eozinofile sau/și mastocite.

IV. 2. Celule imunologic competente

Aceste tipuri de celule se încadrează în seriile limfoplasmocitară și histiomacrofagică ce iau naștere din celula „matcă" sau reticulară nediferențiată a S.C.I., cunoscută mai ales sub denumirea de celulă „stem". Aceste celule sînt pluripotente, generînd toate seriile celulare ale hematopoezei. Morfologic, prezintă o talie mare de 22—28 microni, cu nucleul avînd cromatina laxă cu 2—3 nucleoli mari (foto IV.7).

Citoplasma este largă, franjurată, slab bazofilă, prevăzută cu granulații oxifile. Celulele specializate în elaborarea de anticorpi, în speță plasmocitele și limfocitele, sînt provenite din celula reticulară nediferențiată din măduva hematoformatorie, care populează

Scanned with OKEN Scanner

periodic organele imunologic specializate periferice (limfoganglioni, splină etc.). Aceste celule poartă din punct de vedere embriologic amprenta mezenchimală (M a n o l e s c u, 1976).

Filiaţia celulară de la celula stem la limfoplasmocite şi histio-macrofage se face în mod fazic în organele specializate.

Linia limfo-plasmocitară. În limfoganglioni, splină, sau alte formaţii limfoide, din celula stem nediferenţiată sosită pe cale vasculară din măduva hematoformatorie, iau naştere într-o primă fază, elementele de tip *germinoblastic.*

Germinoblastul are o talie mare de 20—25 microni cu nucleul rotund avînd cromatina reticulară şi 1—2 nucleoli mari. Are o citoplasmă relativ abundentă, intens bazofilă. Celula se poate circumscrie într-un cerc cvasi-perfect. Este totdeauna lipsit de granulaţii.

Din această celulă, ia naştere *limfoblastul.*

Limfoblastul (foto IV.8) este o celulă în mărime de 15—20 microni şi cu raportul nucleo-citoplasmatic în favoarea nucleului. Acesta este de formă ovoidă sau rotundă cu cromatina dispusă regulat în granulaţii avînd 1—2 nucleoli. Citoplasma este intens bazofilă şi agranulată.

Limfoblastul poate genera prin maturare celulele seriei limfocitare iar în unele situaţii se transformă în plasmoblast.

Plasmoblastul este din punct de vedere morfologic, apropiat de limfoblast. Are o talie cuprinsă între 14—18 microni, nucleul mare, ovoid, excentric, cu cromatina tahicromatică şi 1—3 nucleoli. Citoplasma e uşor bazofilă, fără tentă violetă.

Aceste celule precursorii sau „capi de linie", generează celelalte celule atît prin diviziune, cît şi prin diferenţiere ulterioară. Plasmoblastul ia naştere pe două căi: fie direct din germinoblast, fie prin dediferenţierea limfocitului mic în cazul stărilor de „urgenţă imunologică", trecînd prin faza de limfoblast hiperbazofil.

Limfocitul va genera *prolimfocitul* care are o talie de 10—15 microni, cu raportul nucleo-citoplasmatic unitar. Nucleul este rotund sau uşor ovoidal cu cromatina densă, dispusă tahicromatic sub formă de granulaţii mari. Are resturi de nucleoli. Citoplasma este bazofilă (foto IV.11).

Maturarea prolimfocitului duce la apariţia *limfocitului*, celulă cu dimensiuni variabile de 8—15 microni cu raportul nucleo-citoplasmatic în favoarea nucleului; are formă rotundă, cu cromatina densă, tahicromă, fără nucleoli. Citoplasma este intens bazofilă, agranulată sau cu granulaţii aurofile. Din punct de vedere citochimic, caracteristica celulelor seriei limfocitare constă în prezenţa unei cantităţi importante de glicogen intracitoplasmatic.

Citoplasma lor conţine o cantitate mică de mitocondrii şi de ribozomi liberi, un aparat Golgi redus şi este lipsit de reticul ergastoplasmic. Membrana celulară are o structură lipoproteică pluristratificată. Straturile intern şi extern sînt de natură lipidică, iar stratul intermediar este format din macromolecule proteice de tip globulinic, legate prin filamente de tip actomiozinic de straturile din interiorul celulei. Moleculele globulinice componente ale stratului intermediar au o structură care se identifică cu cea a imunoglobulinelor sau cel puţin cu situsurile combinative ale acestora; ele îndeplinesc rolul de receptori pentru antigen şi se pot deplasa între cele două straturi lipide într-un mod comparabil cu bilele unui rulment.

Aceste celule mononucleare cu multiple funcţii au fost denumite de E h r l i c h „limfocite" încă din anul 1878. În general, limfocitele sînt elaborate primar în măduva hematopoetică, timus şi bursa lui Fabricius iar secundar în limfoganglioni, formaţiuni limfoide enterice, splină etc. O caracteristică importantă a limfocitelor constă în

Scanned with OKEN Scanner

aceea că, odată pătrunse în circulaţie, pot trece în ţesuturi şi să revină în circulaţie trecînd printre celulele endoteliale.

Această proprietate este neîntîlnită la alte celule hematopoetice, fiind specifică limfocitelor. Un alt fenomen propriu celulelor limfocitare este acela de a recunoaşte ţesutul specific sistemului limfocitar şi a reveni în el ori de cîte ori este necesar fenomenul denumit nostocytoză.

Limfocitele au mai multe funcţii printre cele mai importante cităm:

— intrarea în relaţie cu antigenele şi răspunsul faţă de acestea;

— păstrarea memoriei după o întîlnire cu un antigen;

— crearea imunităţii celulare şi umorale;

— asigurarea organismului cu celule stem prin dediferenţiere permanentă;

— secreţia de factori limfokinetici.

În organism sînt cunoscute astăzi mai multe feluri de limfocite.

Limfocitele „T" sau timodependente au originea în timus, pot supravieţui luni de zile şi sînt responsabile de instalarea imunităţii mediate celular.

Limfocitele „T" sînt marcate prin antigenele theta (θ) (Thy 1) şi Ly-1, 2, 3, 4 şi 5 prezente şi în ţesutul cerebral. Serurile antitheta obţinute prin imunizarea şoarecilor AKR cu timocite de şoarece C_3H sau CBA au un efect citocid asupra marii majorităţi a celulelor. T. Timocitele exprimă în plus şi antigenul TL (thymusleukemia).

Receptorii de recunoaştere de pe suprafaţa limfocitelor T sînt de tip Ig (pentru antigen). Receptorii Fc (pentru imunoglobuline) sînt prezenţi iniţial la aproximativ 10—15% din celule, iar după activare, proporţia lor creşte considerabil. Receptorii C pentru complement sînt absenţi (după G h e ţ i e, 1977). Ca o consecinţă a prezenţei acestui echipament de receptori, limfocitele T formează rozete E şi sînt negative în testul de rozetare EAC.

Alternativele posibile ale transformărilor pe care un limfocit T antigensenzitiv le poate suferi sub aspectul rolului pe care-l va avea în celelalte etape ale imunogenezei sau ca efector imun, după expunerea sa la antigen, sînt următoarele:

— transformarea într-un limfocit T specific sensibilizat (reactiv sau efector), care este efectorul de bază al imunităţii mediate celular revenindu-i principala responsabilitate mai ales ca factor citotoxic în reacţiile antigrefă, în alergiile de tip întîrziat, în imunitatea antivirală şi în cea antitumorală;

— transformarea într-un limfocit T_2 ajutător sau helper, care va avea rolul de intermediar în transmiterea informaţiei antigenice de la macrofag către un limfocit B;

— transformarea într-un limfocit T_1 sau supresor capabil să diminue sau să limiteze efectul stimulului antigenic pentru producţia de efectori imuni;

— transformarea într-un limfocit T de memorie, responsabil de păstrarea memoriei imunologice atît în imunitatea umorală, cît şi în cea celulară; limfocitele de memorie au totdeauna o viaţă lungă, de 3—5 ani, iar uneori peste 5 ani (W h i t e h e a d 1976; J a n e w a y, 1957) (foto IV. 9, 13, 14).

Limfocitele „B" sau timoindependente sînt produse de măduva hematopoetică la mamifere şi păsări (la care se mai adaugă bursa lui Fabricius). Acestea sînt celule de viaţă scurtă (1—2 săptămîni).

Limfocitele „B" sînt cele ce generează răspunsul imun umoral al organismului după stimulare antigenică.

Limfoblastul provenit dintr-un limfocit B conţine o cantitate mai mare de poliribozomi şi un reticul endoplasmic destul de bine dezvoltat constituit în saci ergastoplasmici. Imunoglobulinele din membrană sînt constituite atît din lanţuri H cît şi L, lanţurile uşoare gamma fiind deja lanţuri complete identice cu cele din structura IgG.

Imunologic, limfocitele B sînt individualizate prin markerul antigenic

Scanned with OKEN Scanner

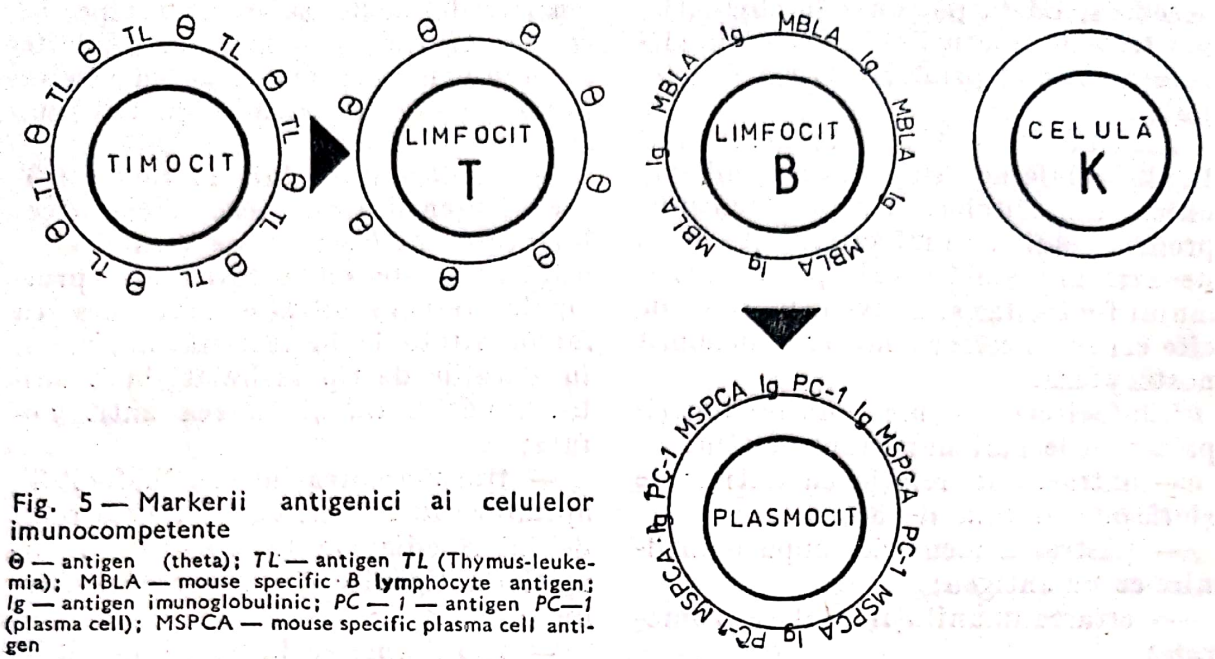


Fig. 5 — Markerii antigenici ai celulelor imunocompetente

Θ — antigen (theta); *TL* — antigen *TL* (Thymus-leukemia); MBLA — mouse specific *B* lymphocyte antigen; *Ig* — antigen imunoglobulinic; *PC — 1* — antigen *PC—1* (plasma cell); MSPCA — mouse specific plasma cell antigen

MBLA — mouse specific B lymphocyte antigen — (R a f f şi col., 1971), care în urma transformării lor în plasmocite se exprimă prin aloantigenul PC-1-plasma cell — (T a k a h a s h i şi col., 1970) şi hetero-antigenul MSPC — mouse specific plasma cell antigen — (T a k a h a s h i şi col., 1971). Serurile anti-MBLA preparate pe iepuri prin inocolări cu limfocite recoltate din ganglioni limfatici de la şoareci CBA timectomizaţi postnatal, apoi iradiaţi letal şi reconstituiţi cu celule fetale, singenice, absorbite apoi cu celule hepatice eritrocite şi timocite, conţin anticorpi cu efect citocid numai pentru limfocitele B, inactive pentru celulele T (R a f f, 1971).

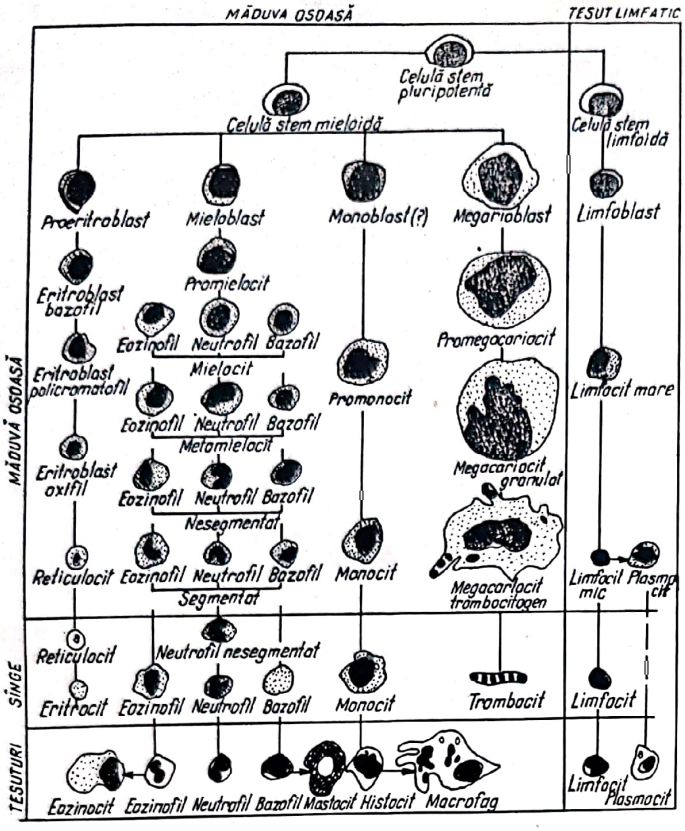
În cazul limfocitelor B receptorii imunoglobulinici pot constitui în acelaşi timp şi markeri antigenici; prin reacţia de imunofluorescenţă cu anticorpi anti-IgG, limfocitele B pot fi diferenţiate de celulele T.

Acest lucru este posibil datorită atît omniprezenţei receptorilor IgG la toate limfocitele B, cît şi proeminenţei mai accentuate a acestora pe suprafaţa membranei celulare, comparativ cu receptorii IgG ai limfocitelor T, situaţi mai profund. Sub aspectul prezenţei receptorilor C şi Fc la populaţiile de limfocite B (după G h e ţ i e, 1977) pot fi deosebite patru tipuri de subpopulaţii: C^+Fc^+, C^-Fc^+, C^+Fc^- şi C^-Fc^-. De aceea limfocitele B răspund pozitiv la testul de rozetare specific EAC, sînt imunoglobuline pozitive şi reacţionează negativ la testul de rozetare E (foto IV.15).

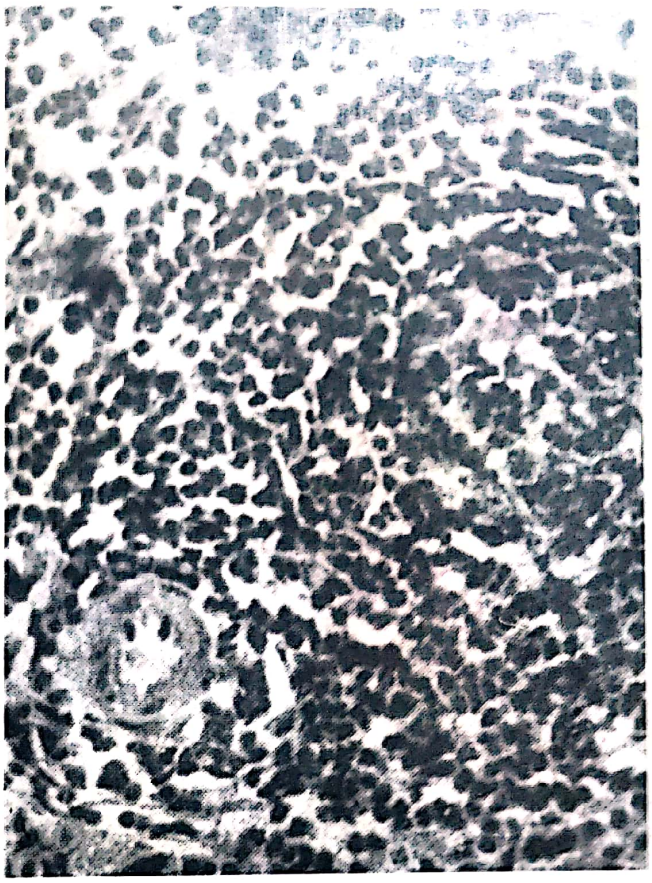
În cadrul fiecărei populaţii de limfocite T şi B se deosebesc de regulă şi alte subpopulaţii, care sînt încă şi mai greu de identificat, necesitînd seruri specifice greu de preparat. M a y e r şi col. (1978) au arătat posibilitatea diferenţierii unor subpopulaţii de limfocite B de şoarece pe baza aderenţei de suprafaţa acestora a unor specii bacteriene.

Limfocitele B intervin în imunitatea umorală, ele transformîndu-se după primirea informaţiei antigenice în plasmocite, producătoare de imunoglobuline (anticorpi) (O w e n şi col., 1974; R a f f, 1973).

Limfocite nule (N) sînt acelea care nu au nici un marker antigenic (fig. 5); ele posedă pe suprafaţa lor receptori Fc, proprietate care le conferă capacitatea de a se fixa pe sediile de cuplare pentru complement ale imunoglobulinelor. De



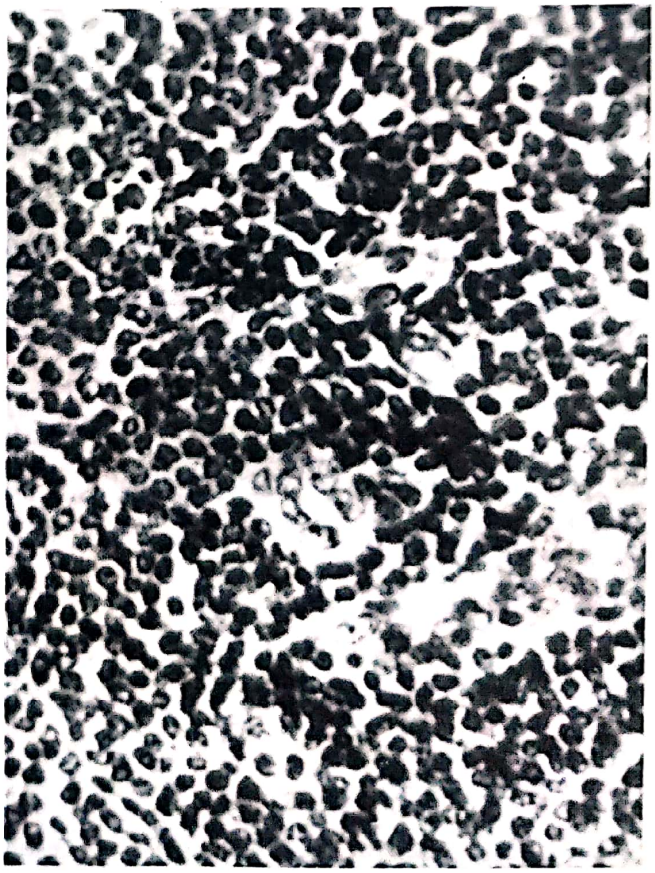
IV — Foto 1 — Schema hematopoezei — cadru general (după S. N. Nicoară, 1972)



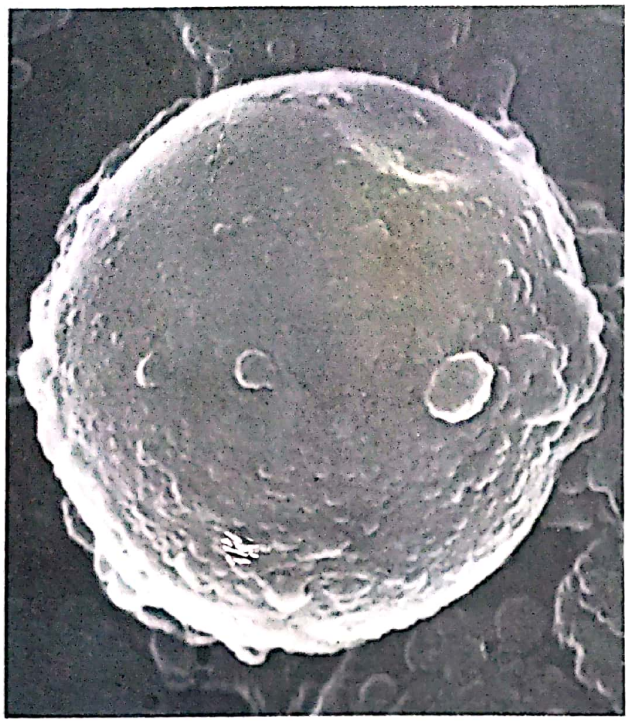
IV — Foto 3 — Pulpă albă splenică — folicul limfoid normal și teaca periarteriolară (col. H. E.) (după G. Simu, 1978)

IV — Foto 2 — Ganglion limfatic nestimulat (normal) (col. H. E.) (după G. Simu, 1978)

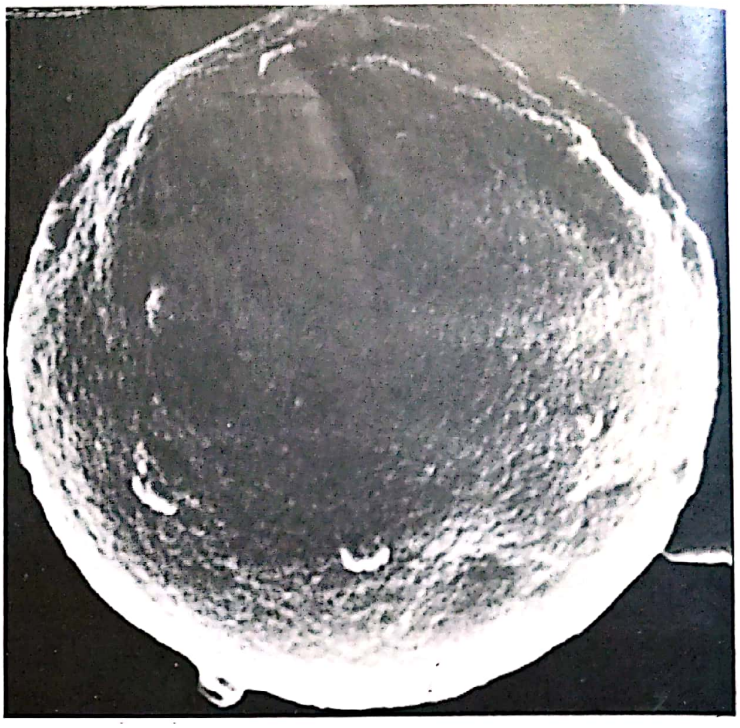
IV — Foto 4 — Splina normală — zona paracorticală și venule postcapilare (col. H. E.) (după G. Simu, 1978)



Scanned with OKEN Scanner



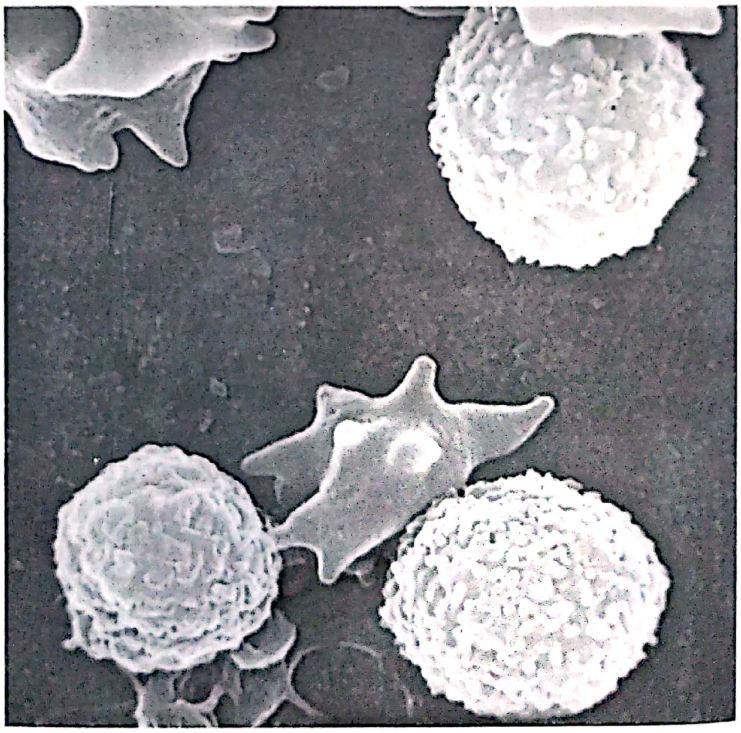
IV — Foto 13 — Limfoblast „T" (SEM), microscopie electronică în baleiaj (×22 000)



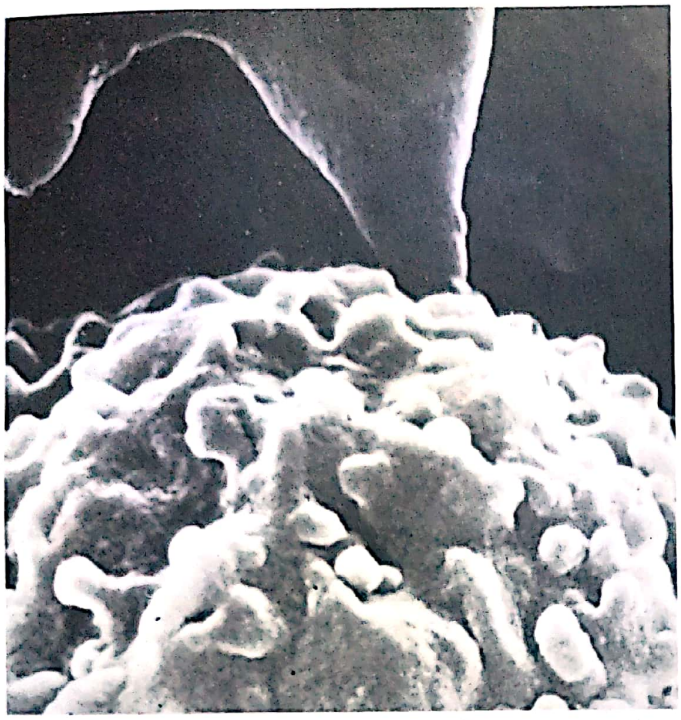
IV — Foto 14 — Limfocit „T" (SEM) (×22 000)

IV — Foto 15 — Limfocit „B" (SEM) (×18 000)

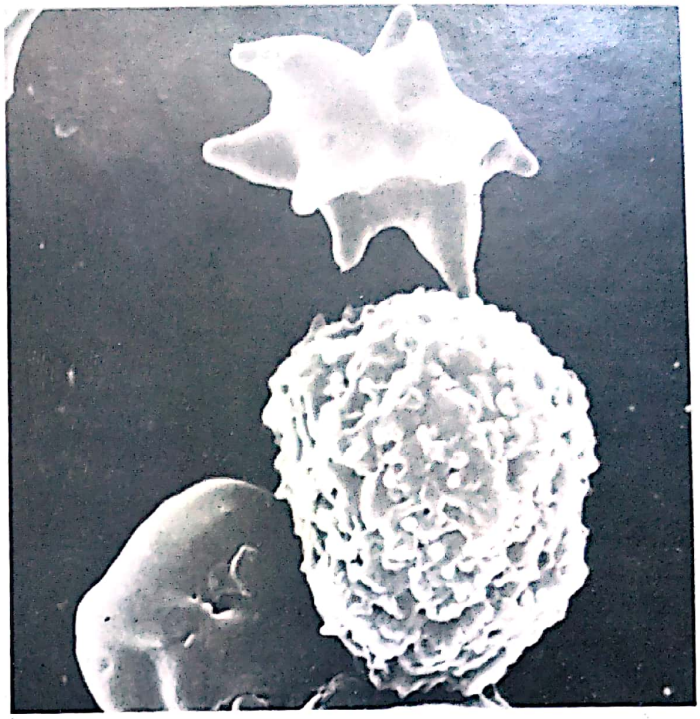
IV — Foto 16 — Limfocit „K"(SEM) (×8 000)



Scanned with OKEN Scanner



IV — Foto 17 — Limfocit „K"
SEM (×60 000)

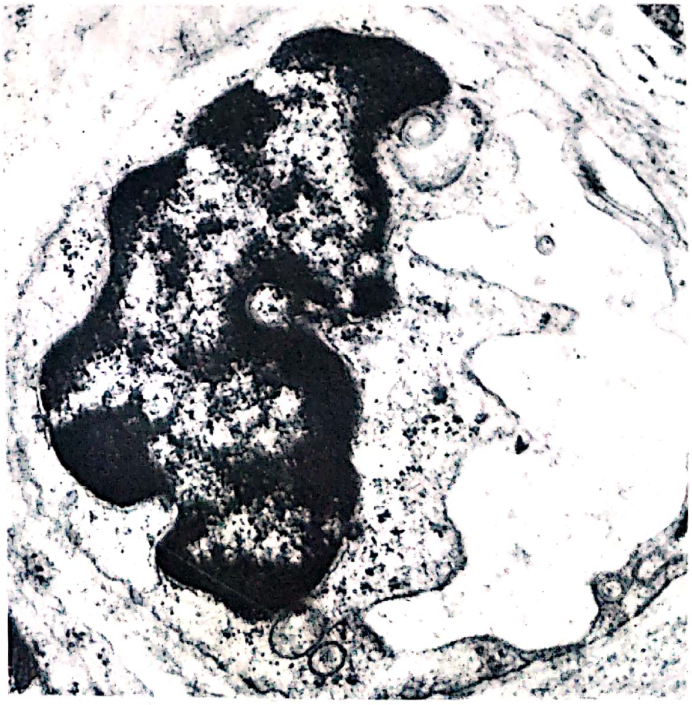


IV — Foto 18 — Limfocite „K"
SEM (×8 000)

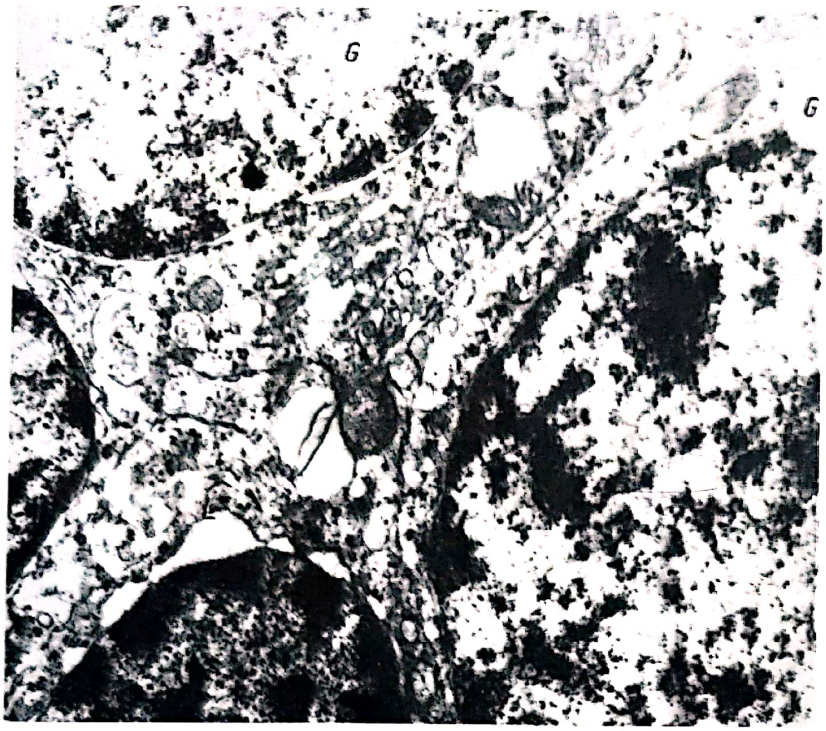
IV — Foto 20 — Monocit SEM
(×15 000)

IV — Foto 19 — Macrofag SEM
(×7 000)

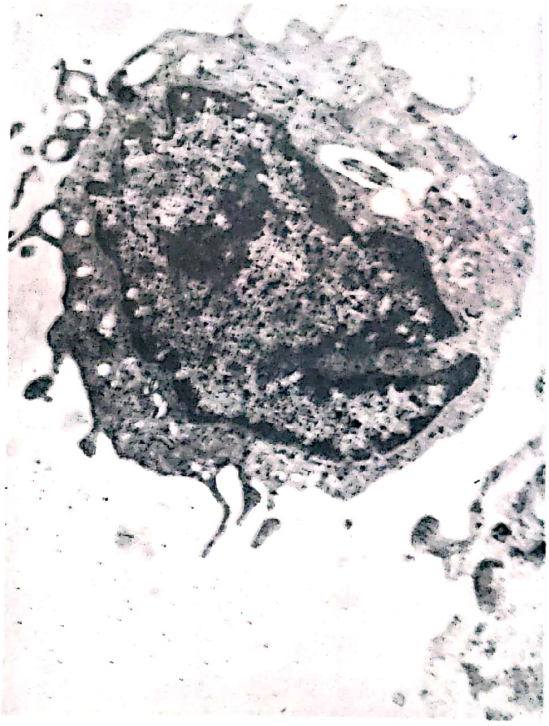
IV — Foto 21 — Capilar în limfoganglion. Celulă endotelială. Microscopie electronică în transmisie (×15 000)



Scanned with OKEN Scanner

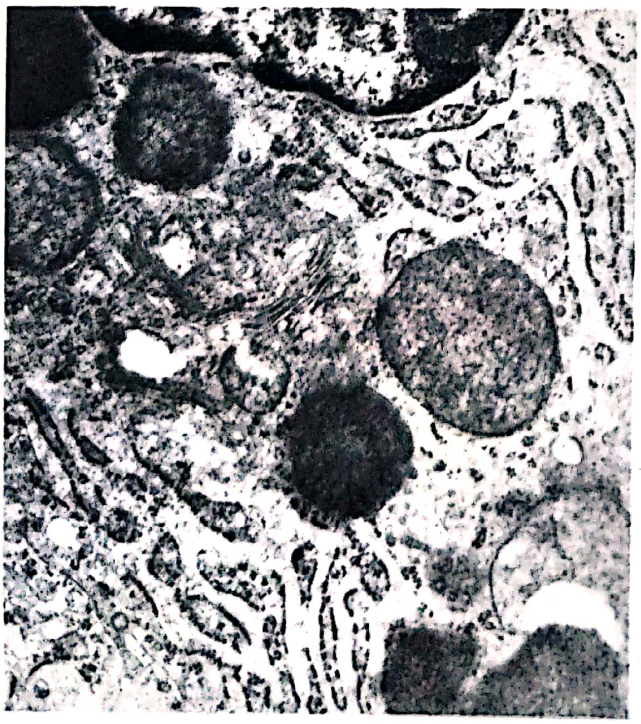


IV — Foto 22 — Detaliul structurii a 2 germinoblaşti şi a unui limfocit. Microscopie electronică în transmisie (×51 000)

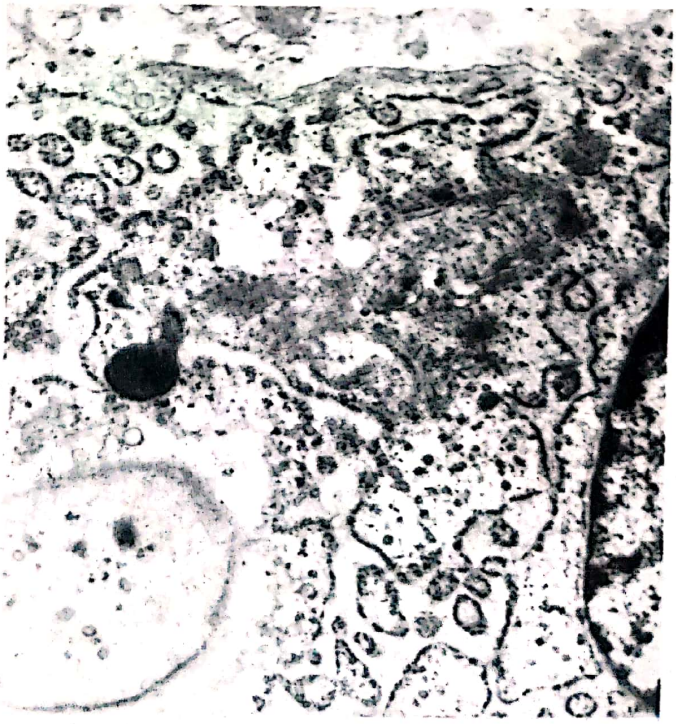


IV — Foto 24 — Macrofag. Microscopie electronică în transmisie (×4 000)

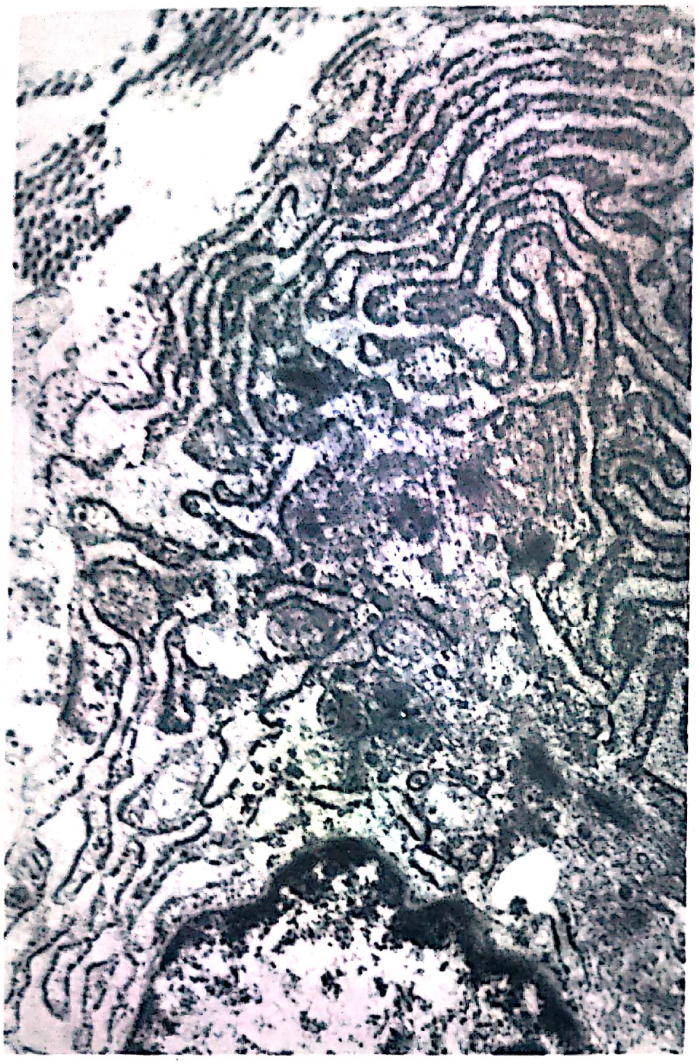
IV — Foto 23 — Detaliu de structură a unei celule Stem III, cu orientare plasmocitară. Microscopie electronică în transmisie (×50 000)



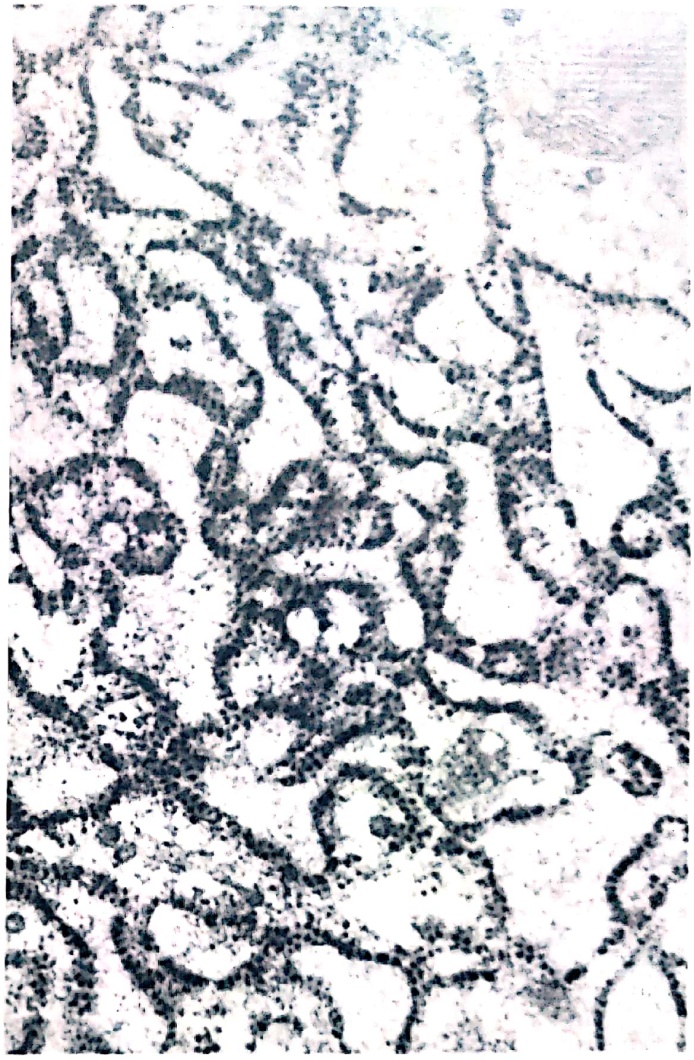
IV — Foto 25 — Plasmoblast. Microscopie electronică în transmisie. Detaliu de structură (×60 000)



Scanned with OKEN Scanner

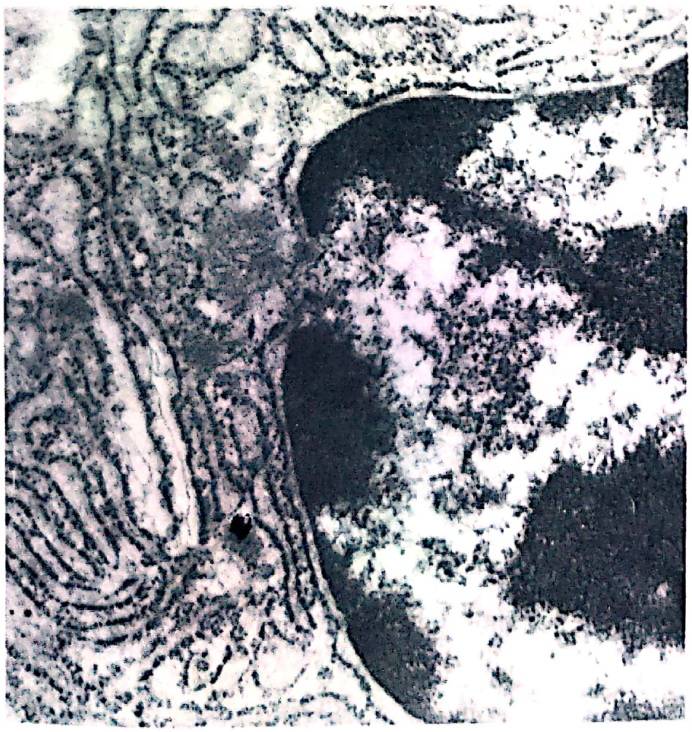


IV — Foto 26 — Plasmocit. Microscopie electronică de transmisie (×30 000)

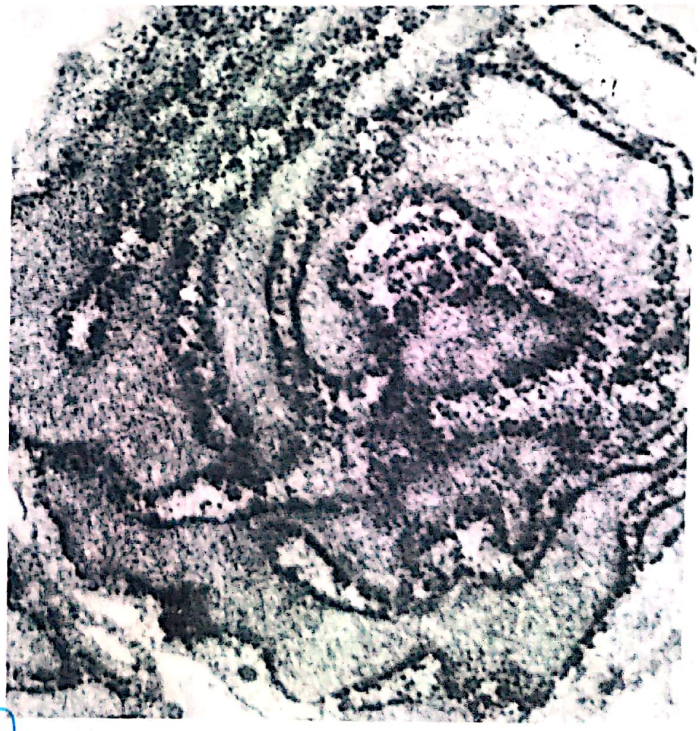


IV — Foto 28 — Plasmocit. Detaliu al aspectului ergastoplasmei (R.E.R.). Microscopie electronică în transmisie (×70 000)

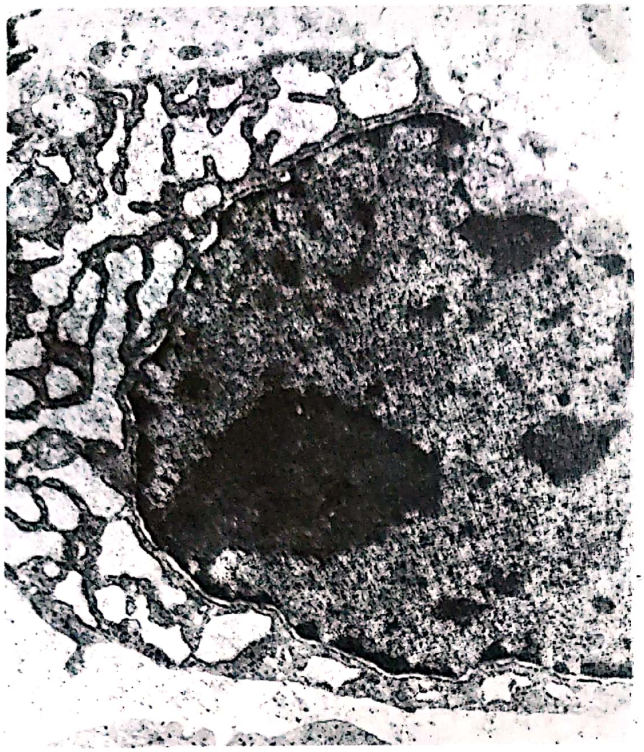
IV — Foto 27 — Plasmocit. Microscopie electronică în transmisie (×40 000)



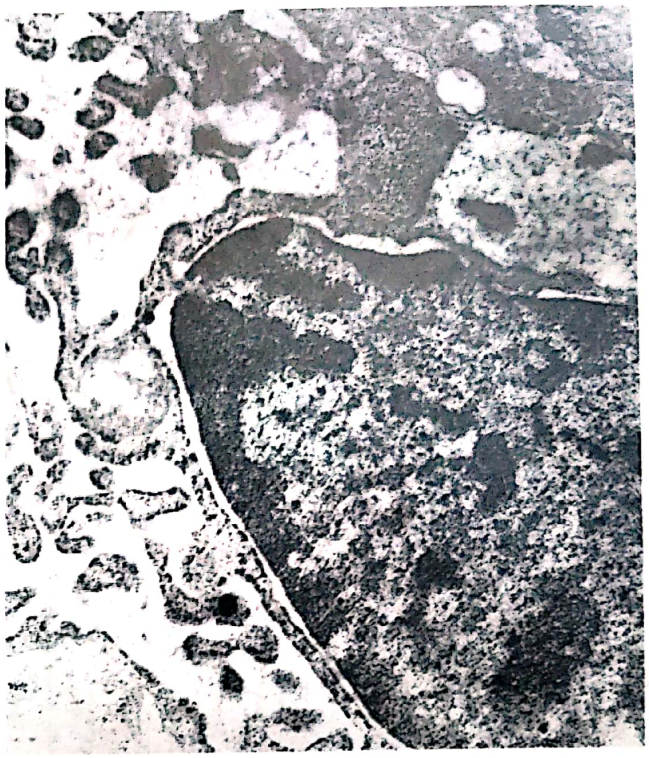
IV — Foto 29 — Plasmocit. Detaliu al organizării citoplasmatice. Microscopie electronică în transmisie (×45 000)



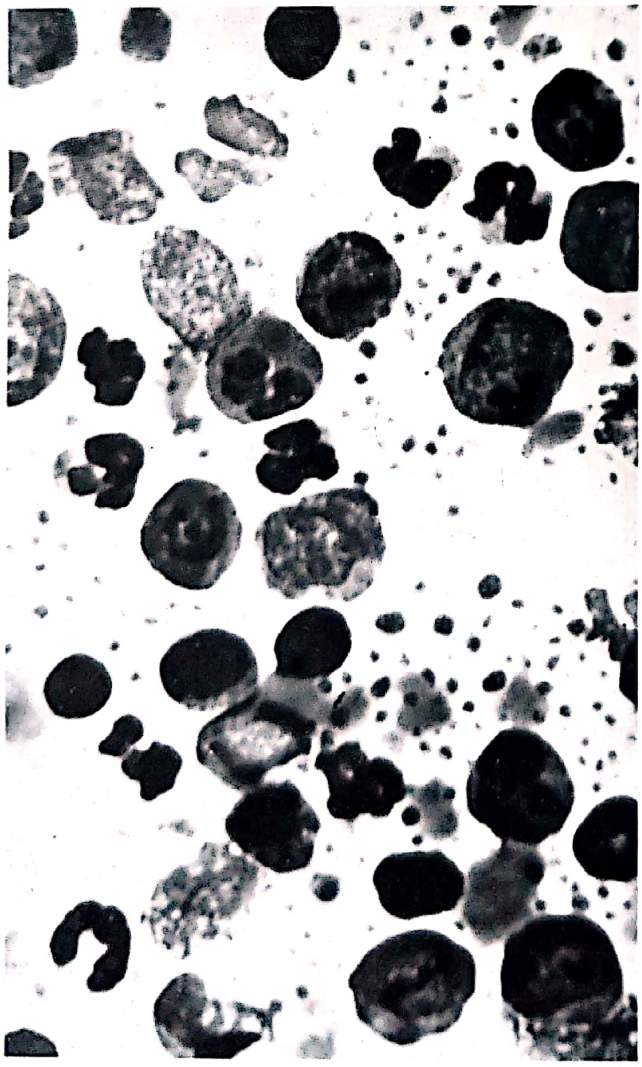
Scanned with OKEN Scanner



IV — Foto 30 — Plasmocit transformat în celulă Mott. Microscopie electronică în transmisie (×20 000)

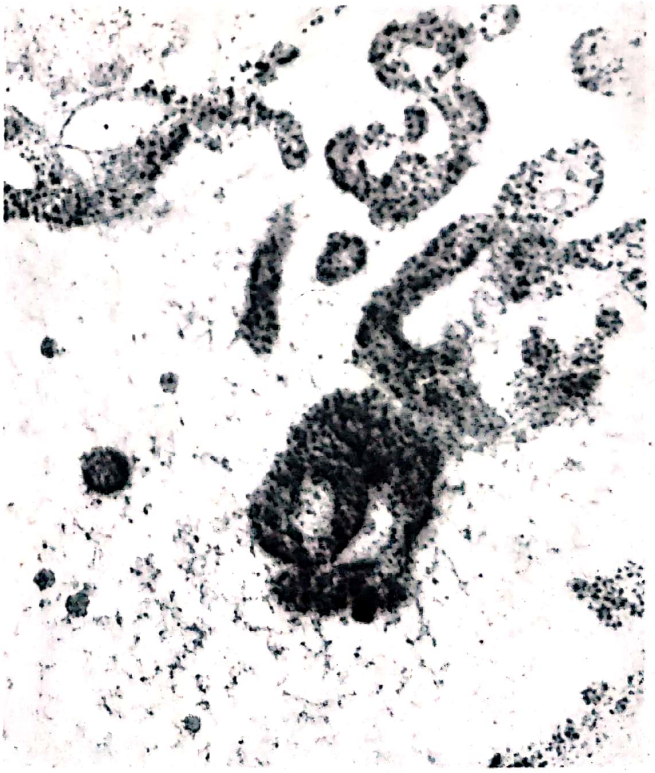


IV — Foto 31 — Celulă Mott. Detaliu al modificărilor din citoplasmă, crearea a veritabile „lacuri" de secreţie de imunoglobuline (×46 000)

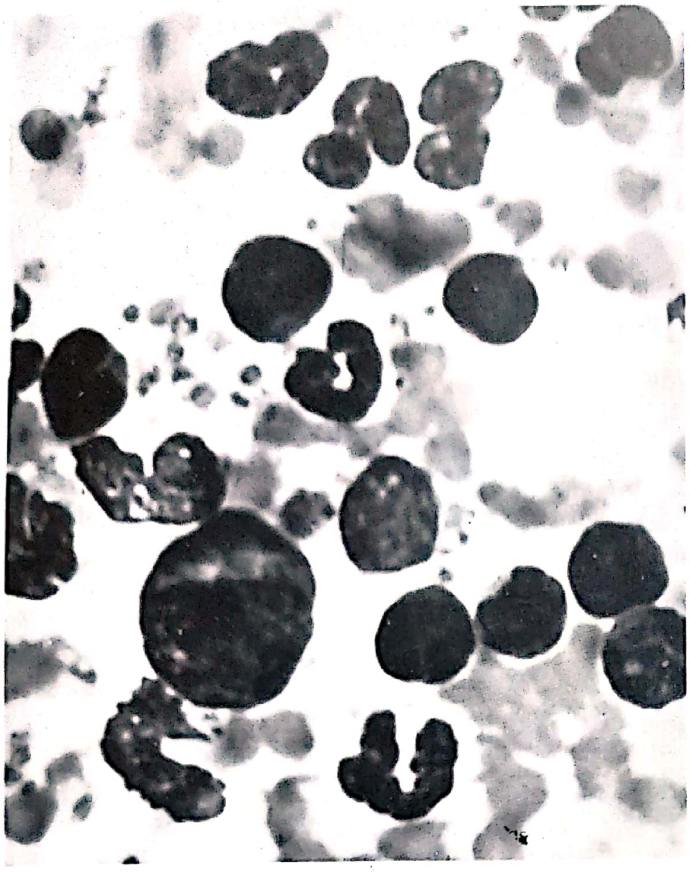


IV — Foto 33 — LCT porc (MGG). La 6 zile de la inocularea unui singur antigen. Prezenţa importantă de imunoblaşti şi imunocite (×1 500)

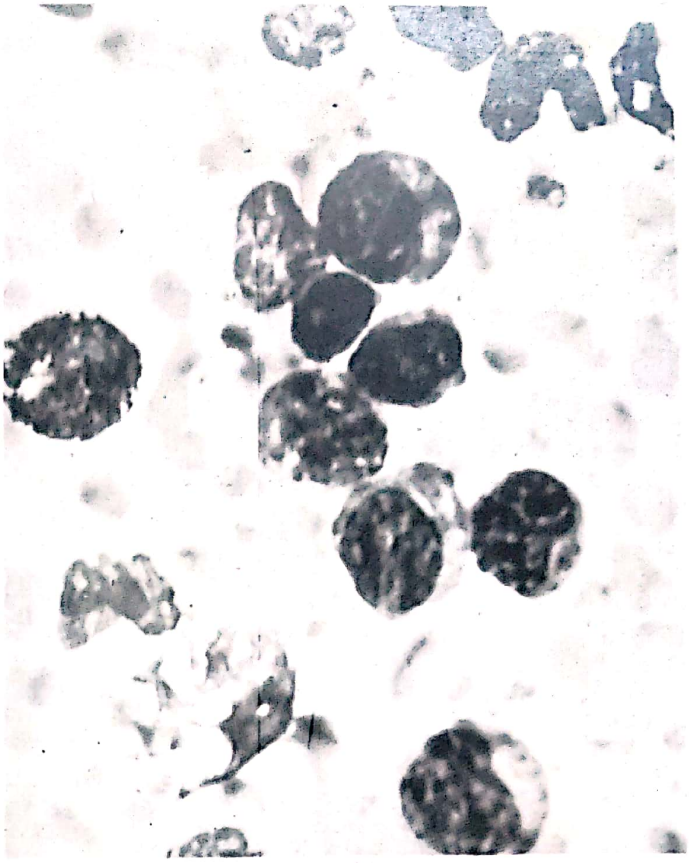
IV — Foto 32 — Acelaşi aspect (×90 000)



Scanned with OKEN Scanner

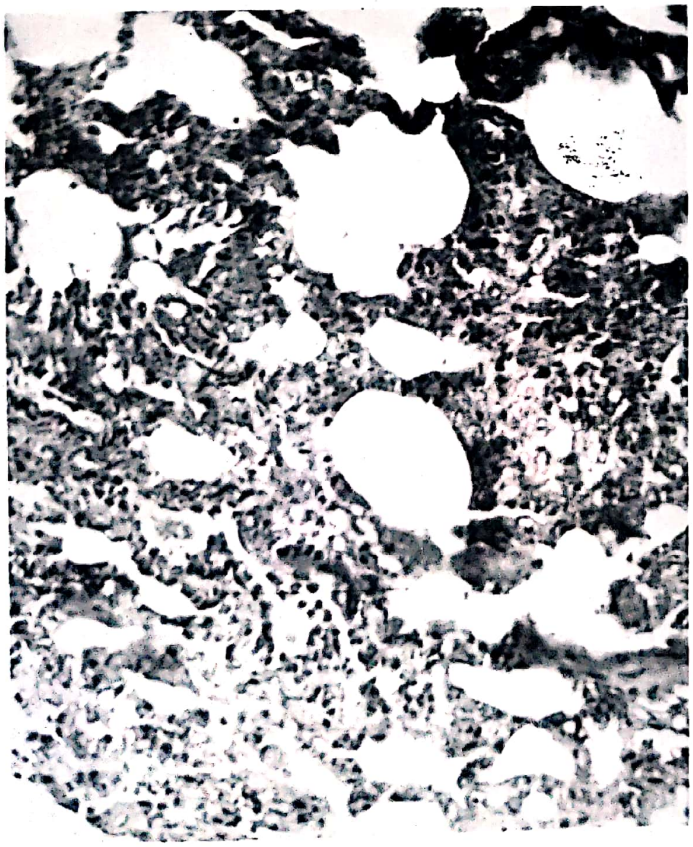


IV — Foto 34 — LCT porc (MGG). Reacţie imunocitaro-plasmoblastică la 4 zile de la inocularea mai multor antigene (×1 500)

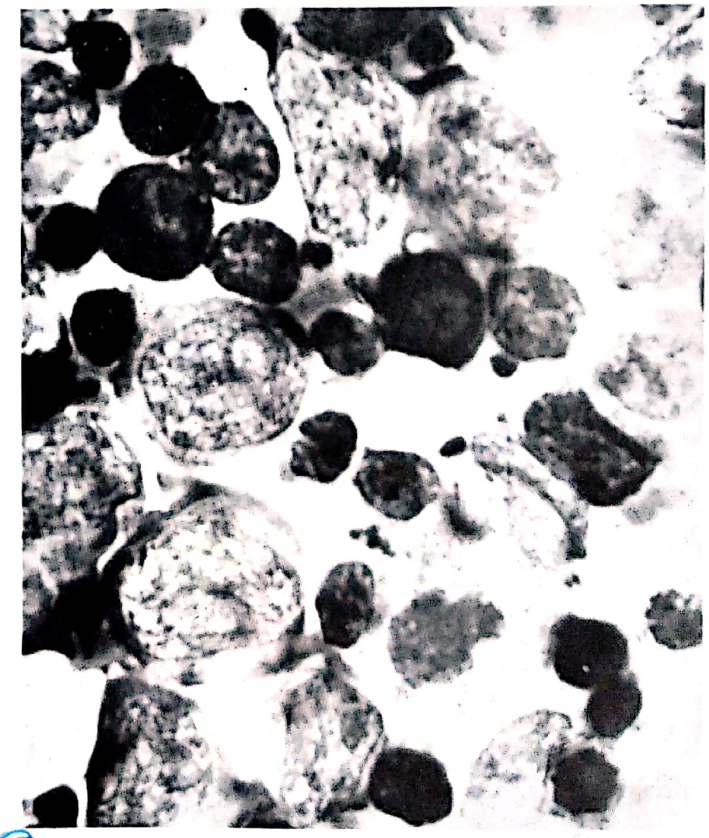


IV — Foto 35 — LCT porc (MGG). Importantă diferenţiere plasmocitară la 8 zile de la inocularea mai multor antigene (×1 500)

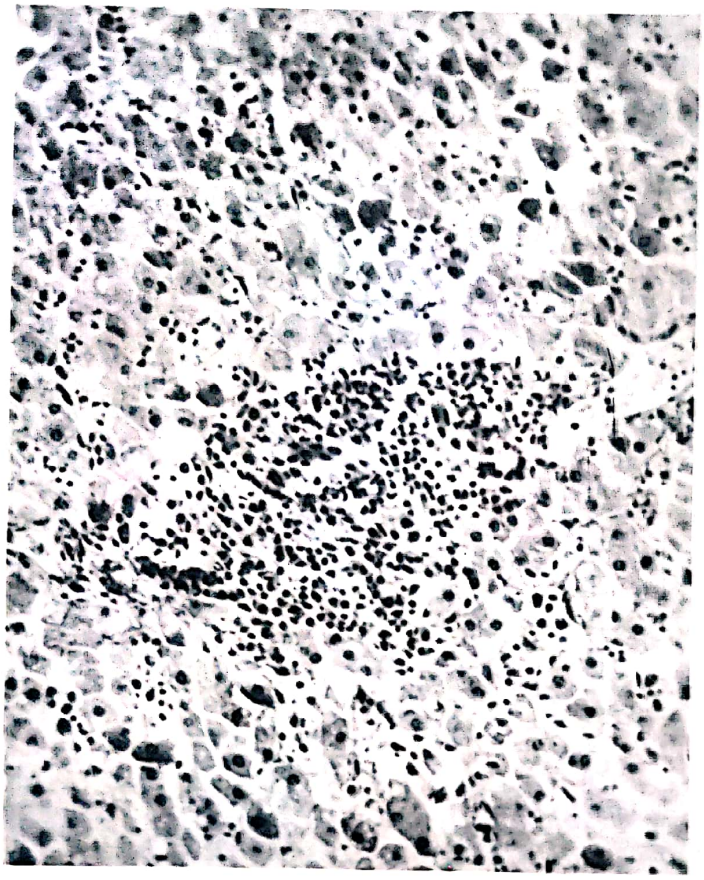
IV — Foto 37 — Pulmon — hiperimunizare cu toxine bacteriene. Pneumonia imună (H. E. ×200)



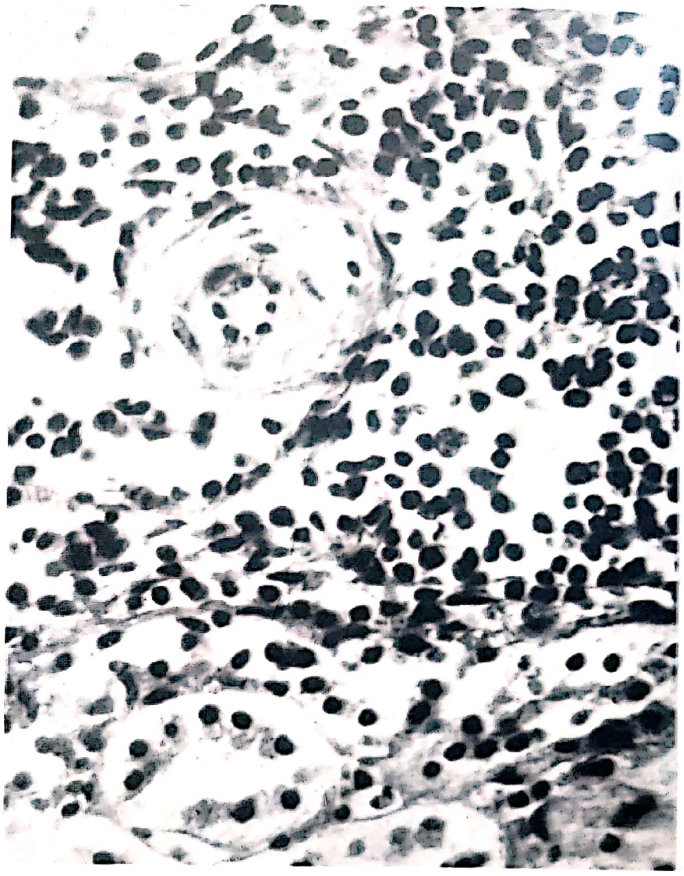
IV — Foto 36 — Adenogramă (MGG). Reacţia imună de debut, exprimată prin intensă proliferare a celulelor germinoblastice şi imunoblastice (×1 500)



Scanned with OKEN Scanner

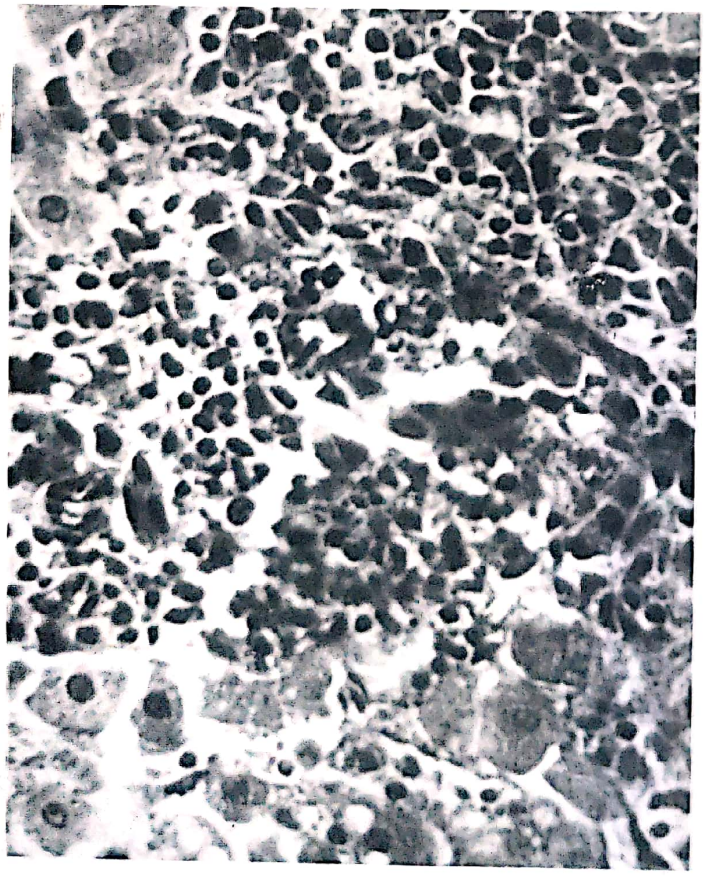


IV — Foto 38 — Ficat — hiperimunizare cu toxine bacteriene. Aspect pseudoleucemic similar cu leziunile din A.I.E. (×200 — H. E.)

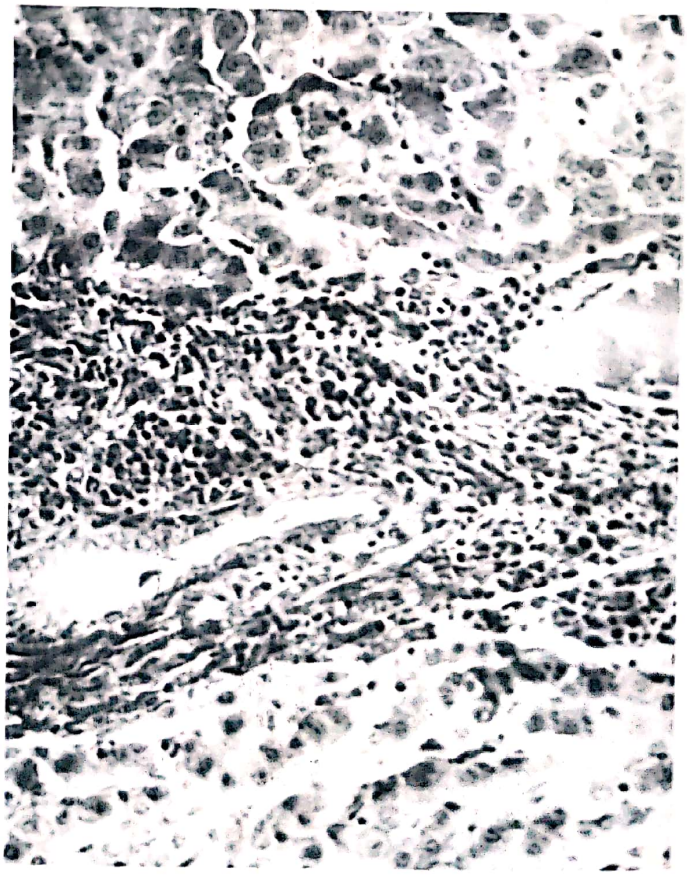


IV — Foto 40 — Rinichi — hiperimunizare cu toxine bacteriene aspect pseudoleucemic. Celule imunologic competente în diferite momente de diferenţiere. Nefrită imună (×400 H. E.)

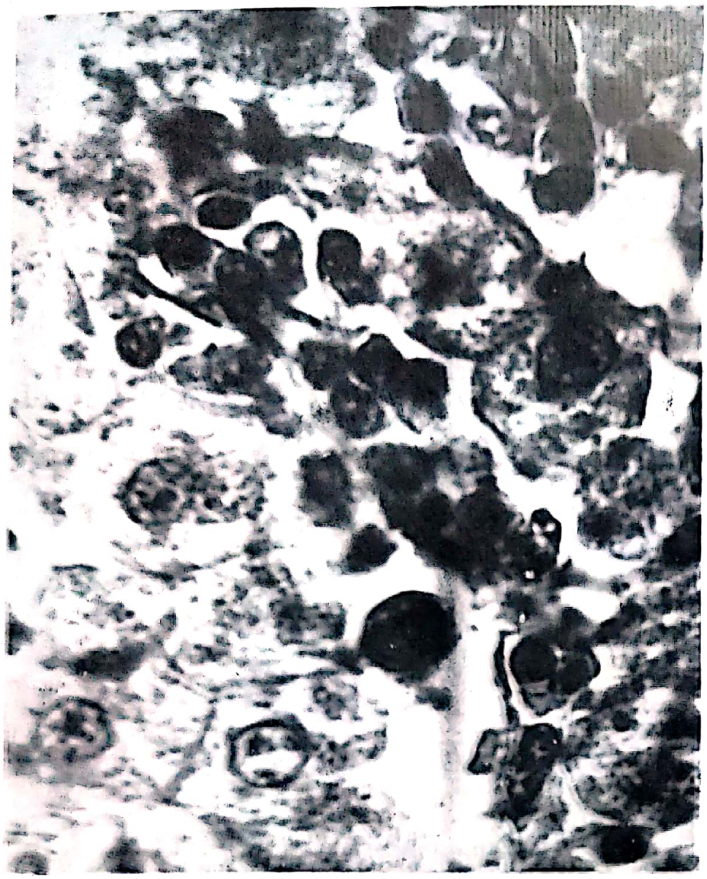
IV — Foto 39 — Acelaşi aspect, hepatită imună (×600)



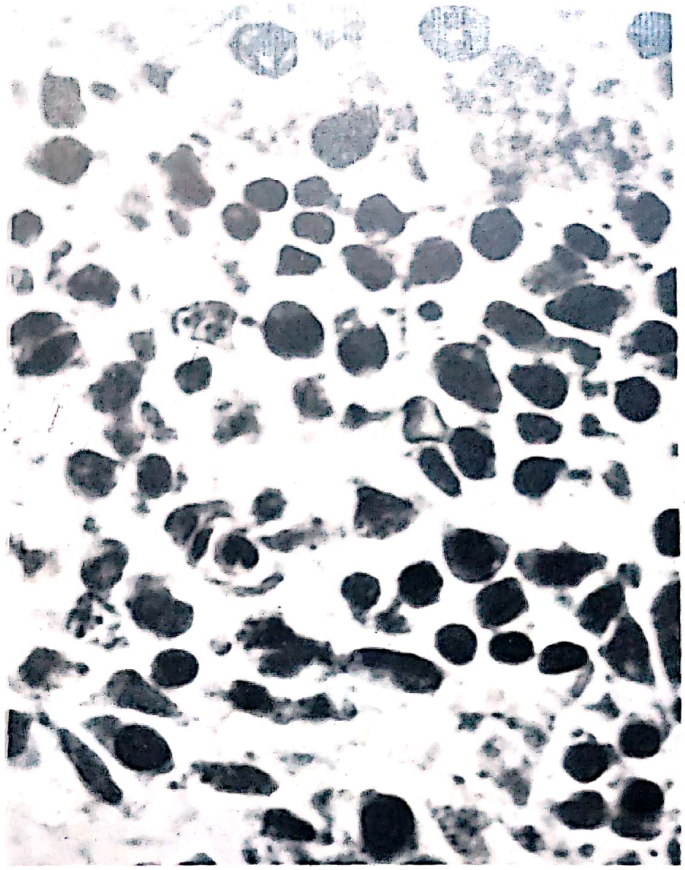
IV — Foto 41 — Ficat — hiperimunizare cu corpusculi bacterieni. Infiltraţie în spaţiul Kiernan. Hepatită imună (H. E. ×300)



Scanned with OKEN Scanner

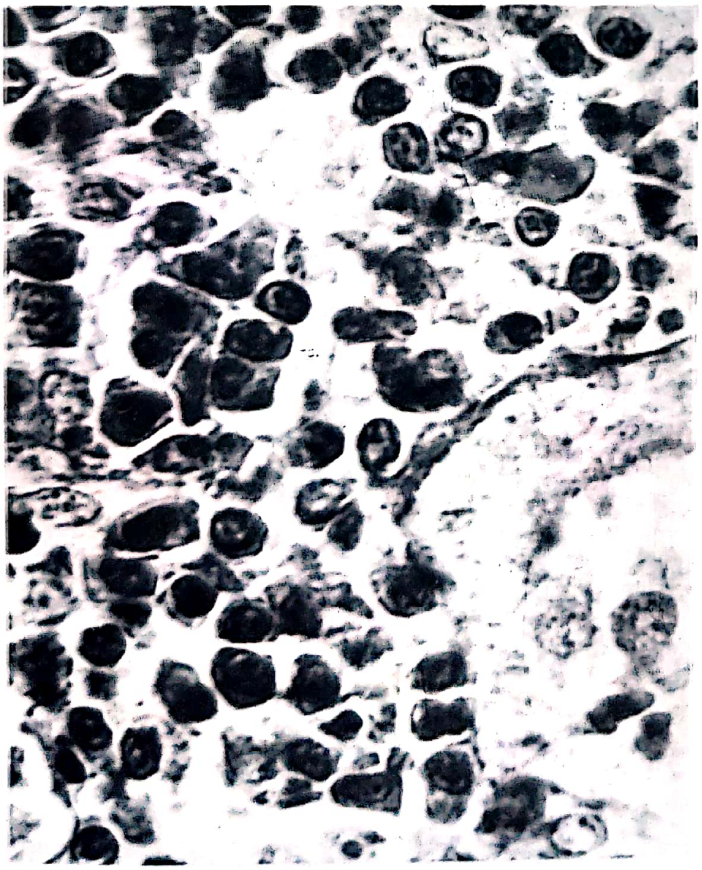


IV — Foto 42 — Ficat — hiperimunizare cu toxine bacteriene. Infiltrație în spațiul Disse. Hepatită imună (H. E. × 750)

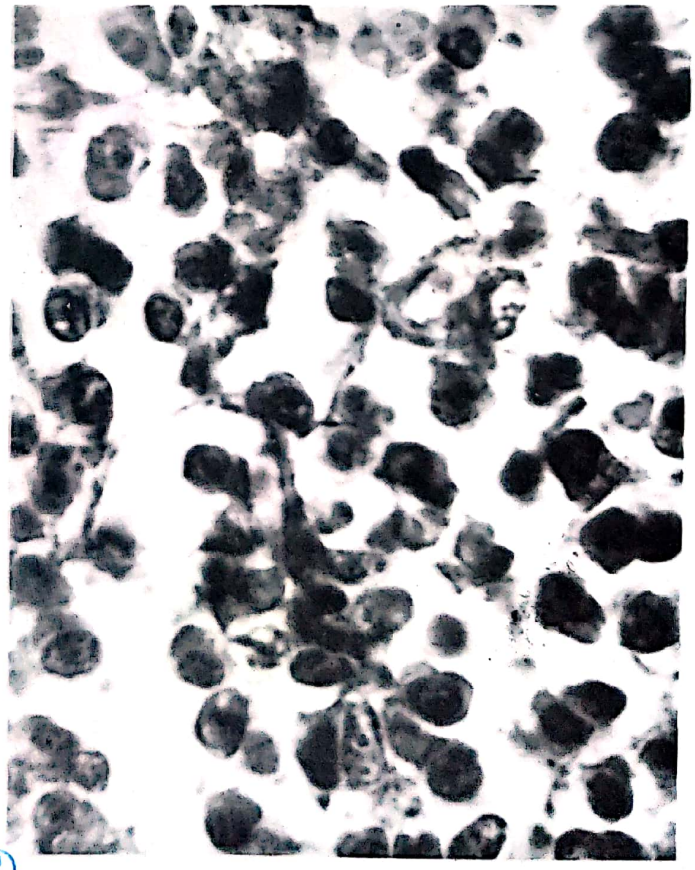


IV — Foto 44 — Ficat — hiperimunizare cu toxine bacteriene. Hepatită imună. Dislocarea cordoanelor Remack de către celulele imunologic competente (H. E. × 750)

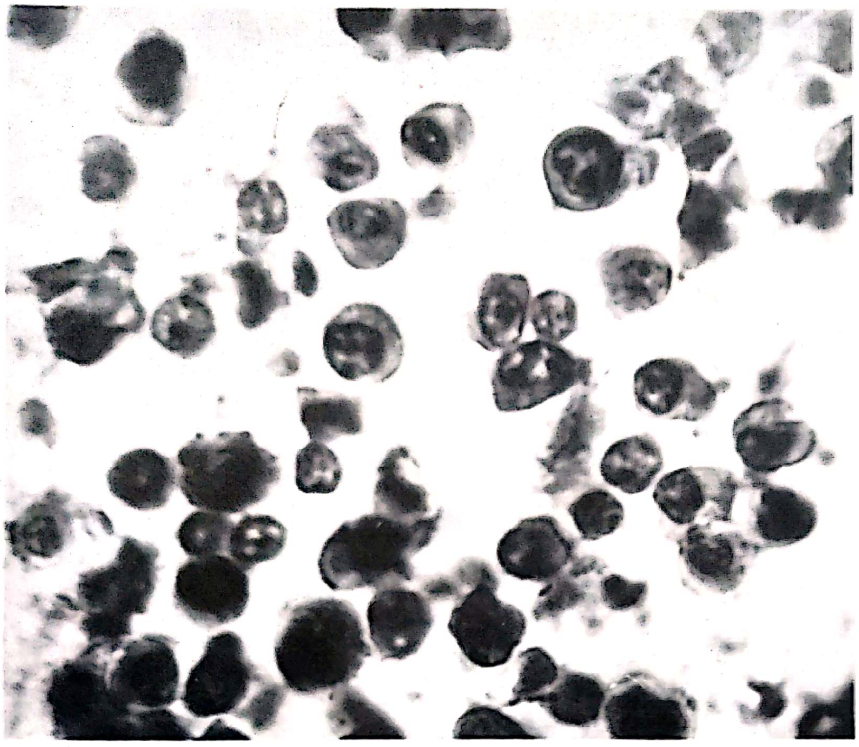
IV — Foto 43 — Ficat — hiperimunizare cu corpusculi bacterieni. Înlocuirea țesutului nobil de către celule imunologic competente. Hepatită imună (H. E. × 750)



IV — Foto 45 — Ganglioni — hiperimunizare cu toxine bacteriene. Proliferare plasmoblastico-plasmocitară în centrul germinativ (H. E. × 750)



Scanned with OKEN Scanner

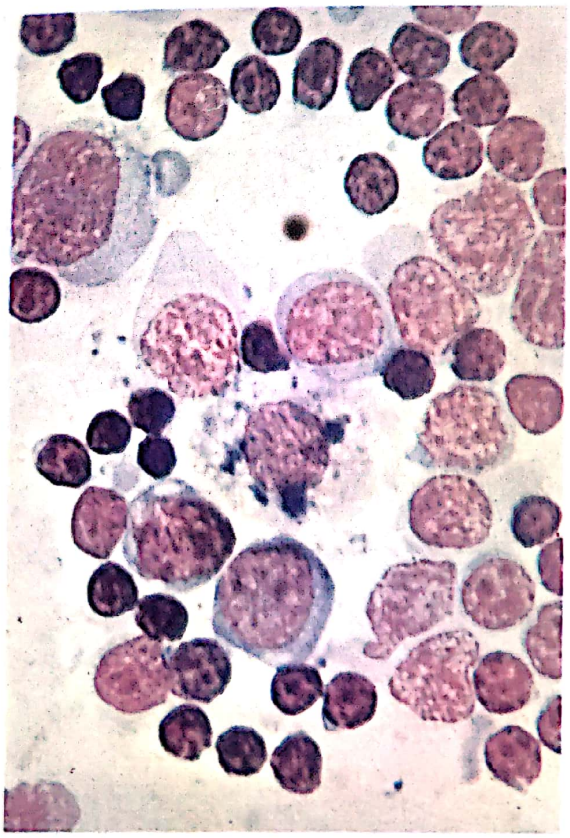


IV — Foto 46 — Acelaşi aspect în sinus, limfadenita imună (H. E. ×750)

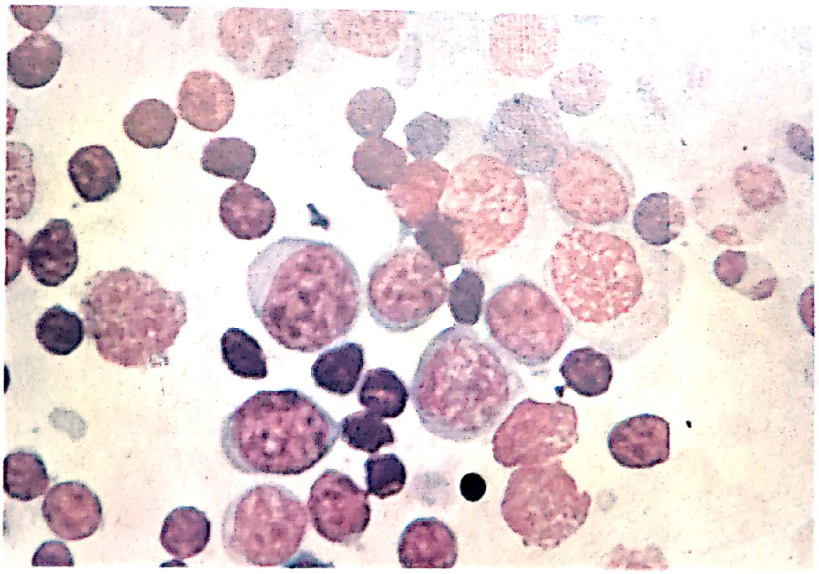
IV — Foto 47 — Rinichi — imunofluorescenţă IgG în glomerul. Nefrită autoimună în hiperimunizarea cu toxine bacteriene (×600)

IV — Foto 48 — Acelaşi aspect, dar în zona tubilor contorţi ×600

Scanned with OKEN Scanner

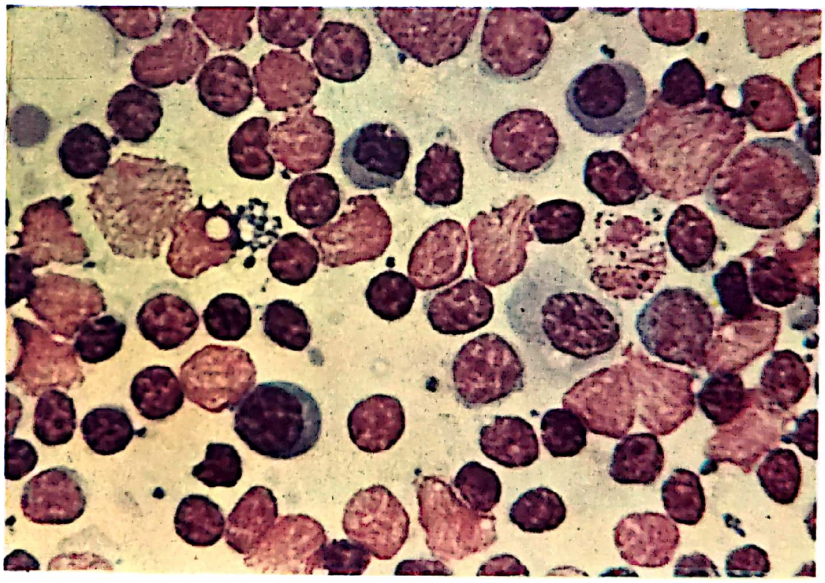


IV — Foto 49 — Splenogramă. La 3 zile după inocularea unui antigen. Reacţie reticulară şi macrofagică importantă (MGG x 1 500)

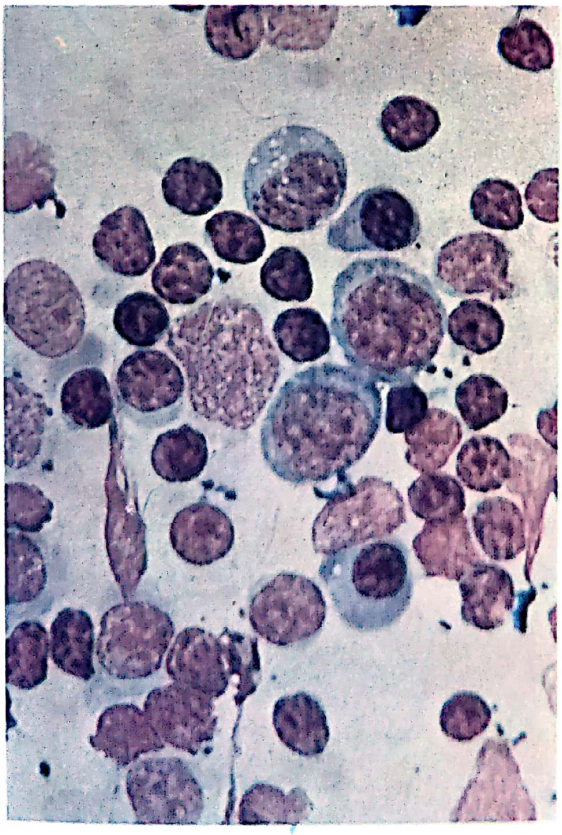


IV — Foto 50 — Andenogramă. La 4 zile după inocularea unui antigen. Reacţia reticulară cu început de diferenţiere plasmoblastică (MGG x 1 500)

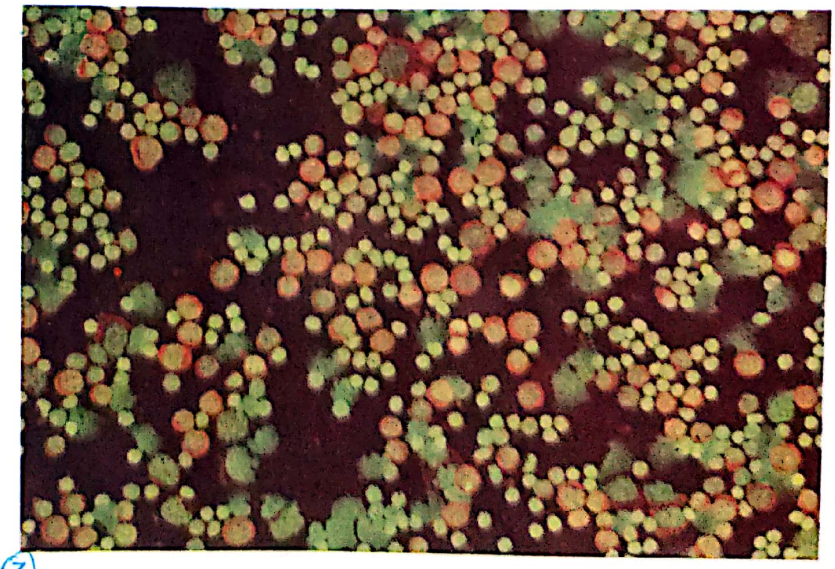
IV — Foto 52 — Splenogramă. La 6 zile după inocularea unui antigen. Reacţie plasmocitară evidentă (MGG x 1 500)



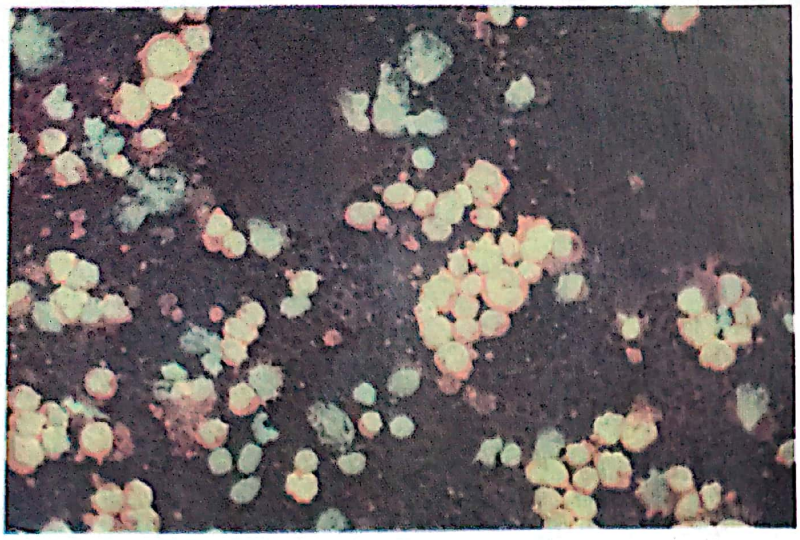
IV — Foto 51 — Adenogramă. La 7 zile după inocularea unui antigen. Reacţie plasmocitară evidentă (MGG x 1 500)



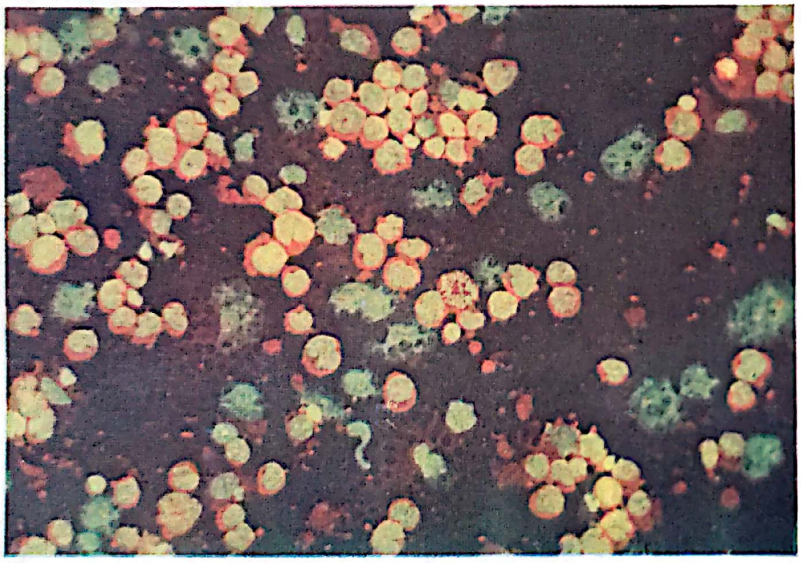
IV — Foto 53 — Adenogramă. La 5 zile de la inocularea antigenului (Acridin Oranj x 1 500)



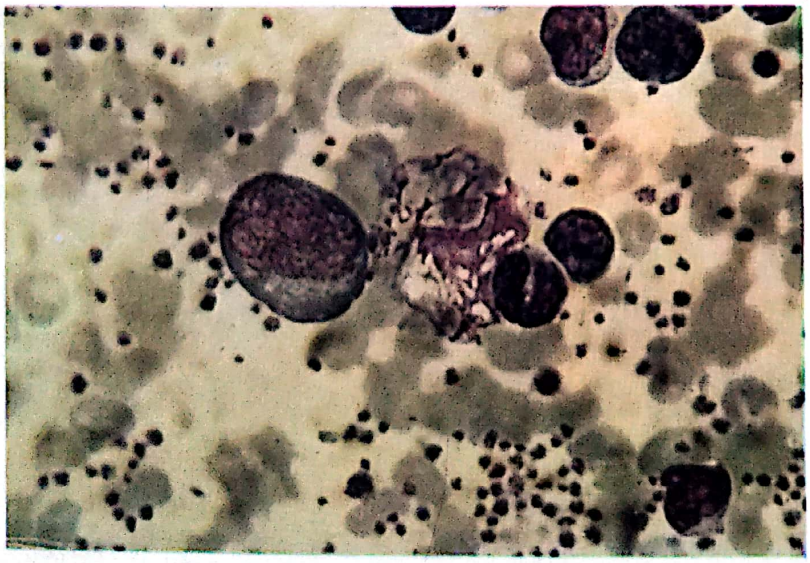
Scanned with OKEN Scanner

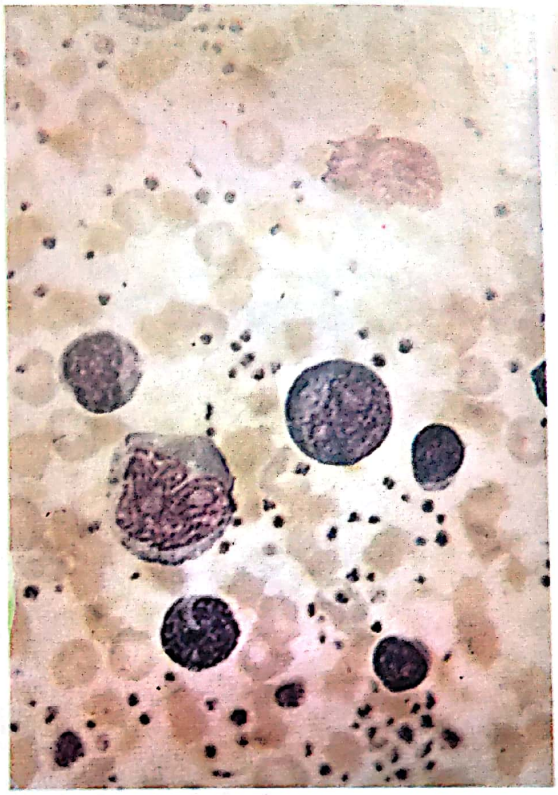


IV — Foto 54 — Splenogramă. La 4 zile de la inocularea unui antigen (Acridin oranj ×1 500)



IV — Foto 56 — LCT porc. La 2 zile de la inocularea unui antigen. Prezența în circulație a unei celule stem (MGG ×1 500)



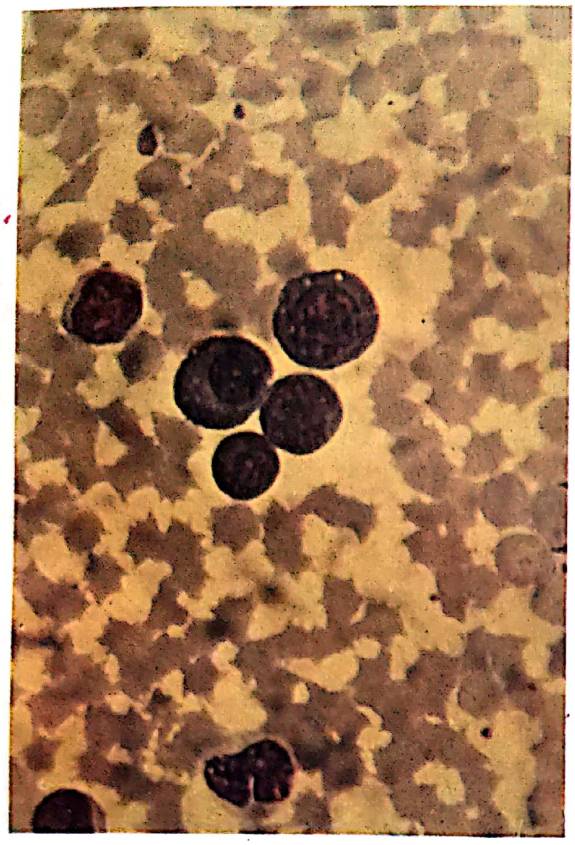


IV — Foto 55 — Splenogramă. La 8 zile de la inocularea unui antigen. Numeroase celule cu citoplasma roșu-flacără (Acridin oranj ×1 500)

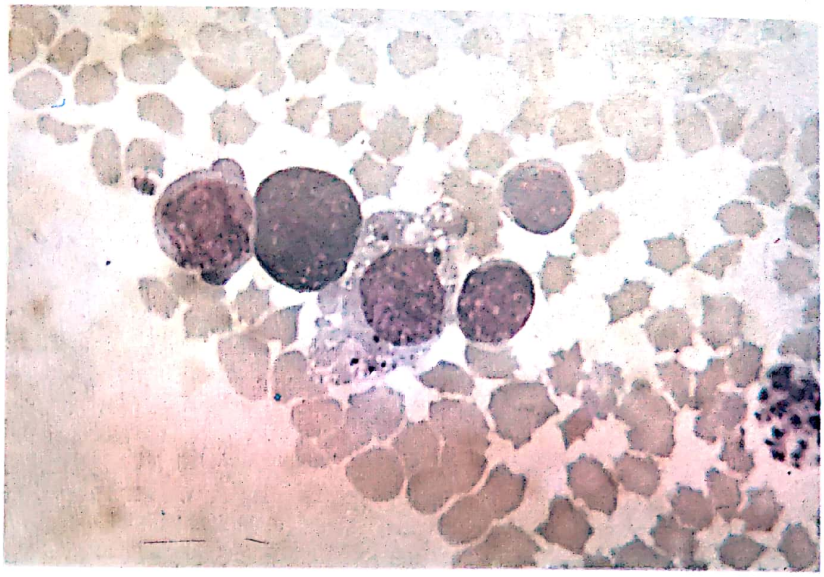
IV — Foto 57 — LCT porc. La 5 zile de la inocularea unui antigen (MGG×1 500)

IV — Foto 58 — LCT porc. La 7 zile de la inocularea mai multor antigene. Frecvente celule plasmoblastice și plasmocitare (MGG ×1 500)

Scanned with OKEN Scanner

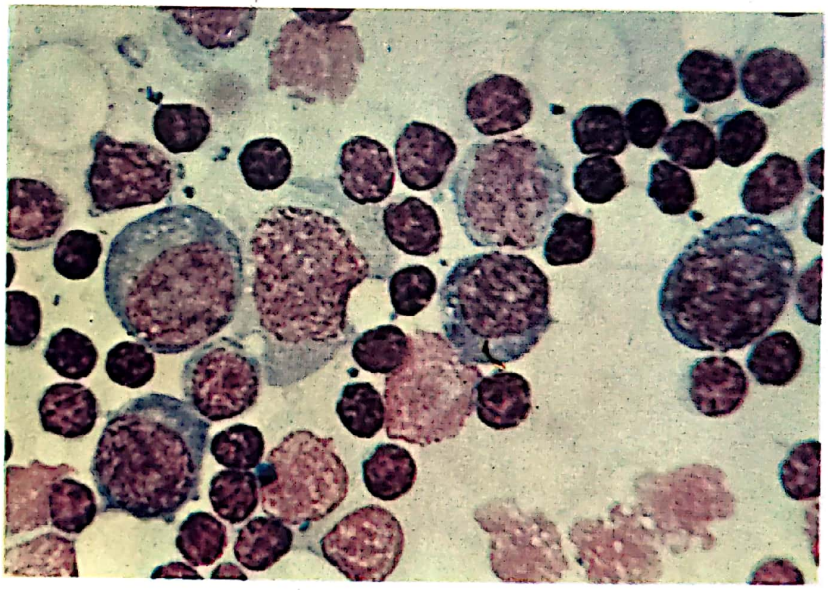


IV — Foto 59 — LCT porc. La 9 zile de la inocularea mai multor antigene. Importantă prezenţă plasmocitară (MGG × 1 500)

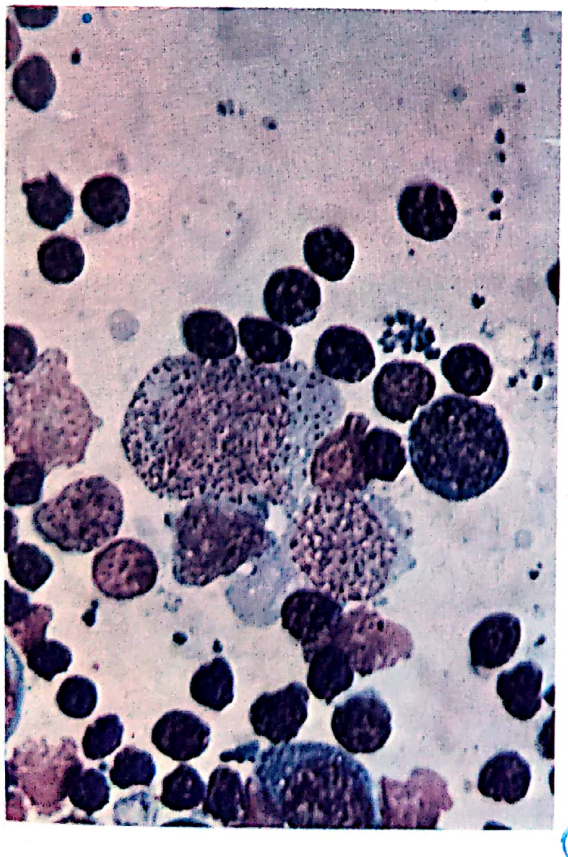


IV — Foto 60 — LCT. Reacţie macrofag — Imunoblast — limfocit (MGG ×1 500)

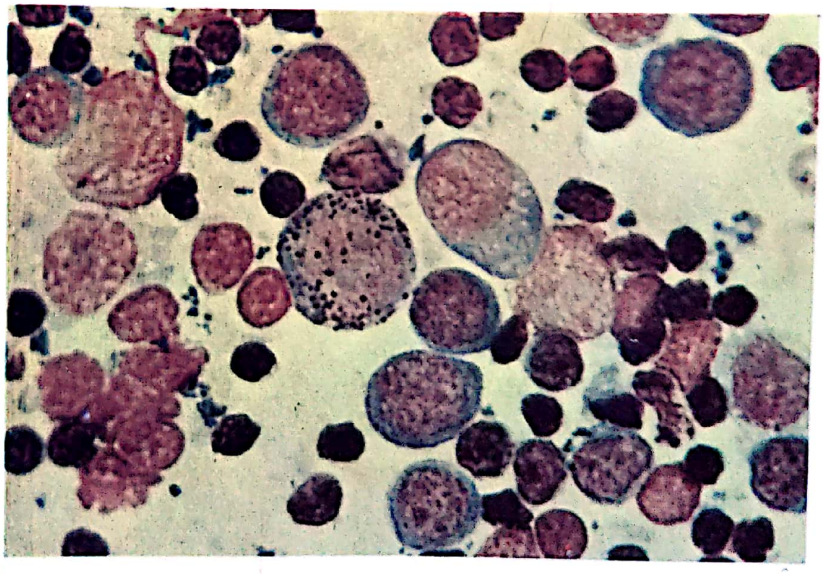
IV — Foto 61 — Adenogramă — hiperimunizare cu toxine bacteriene (MGG 1 500)



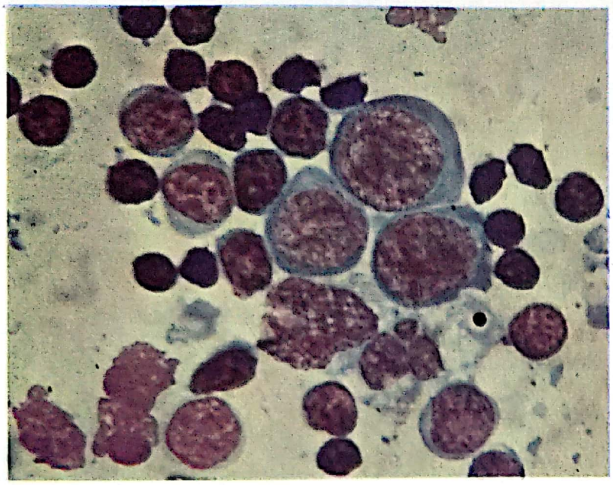
IV — Foto 62 — Splenogramă — hiperimunizare cu corpusculi bacterieni (MGG ×1 500)



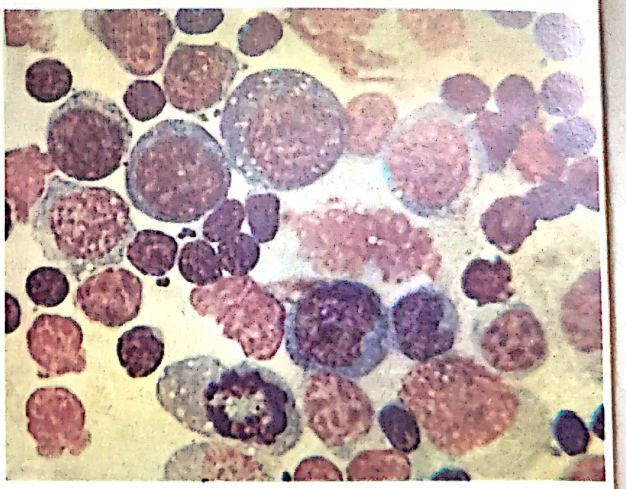
IV — Foto 63 — Splenogramă — hiperimunizare cu toxine bacteriene (MGG ×1 500)



Scanned with OKEN Scanner

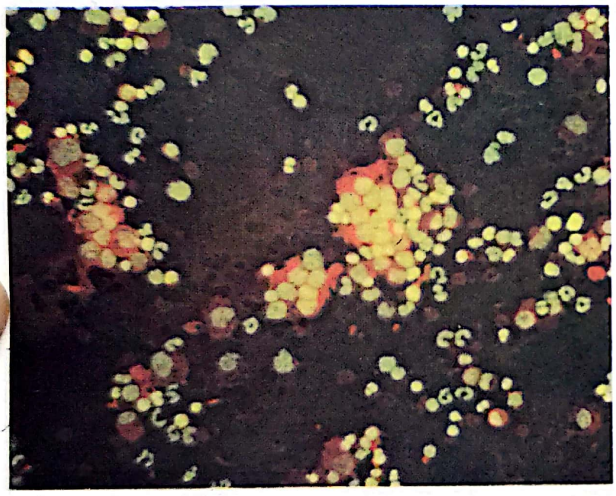


IV — Foto 64 — Adenogramă — hiperimunizare cu toxine bacteriene (MGG 1 500)

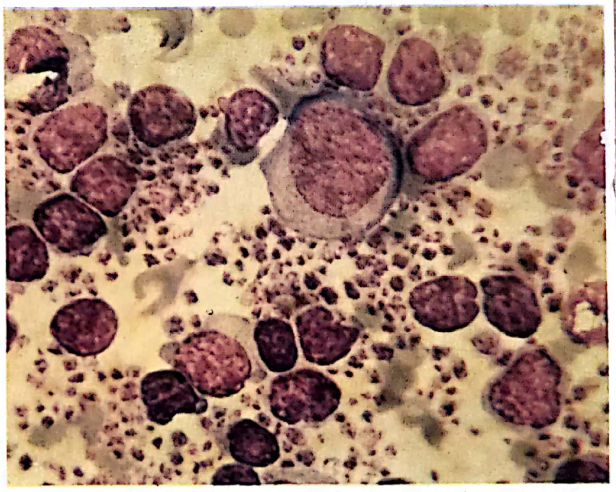


IV — Foto 65 — Adenogramă — hiperimunizare cu virus (MGG ×1 500)

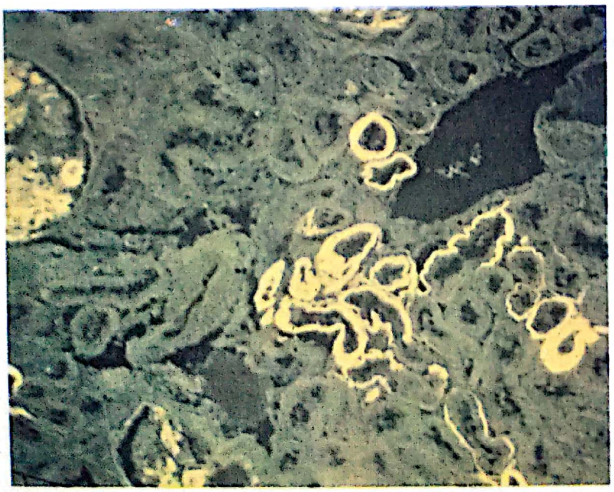
IV — Foto 66 — Adenogramă — hiperimunizare cu virus (Acridin oranj × 1 500)



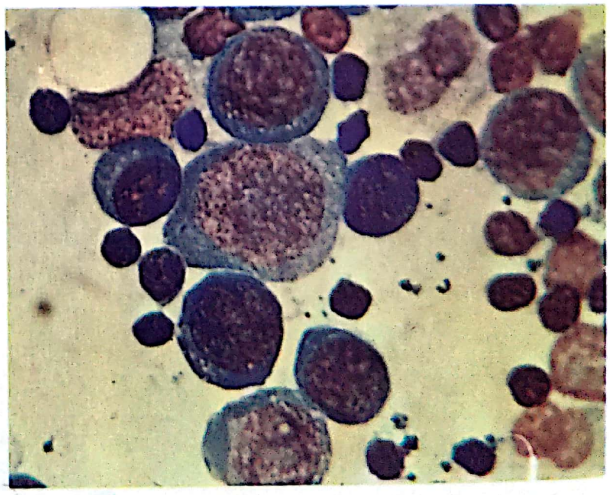
IV — Foto 67 — LCT porc — hiperimunizare cu virus aspect pseudoleucemic (× 1 500)



IV — Foto 68 — Rinichi — hiperimunizare cu toxine bacteriene. Prezenţa amiloidului globular şi în tubi. Nefrită imună (Tioflavină S ×400)



IV — Foto 69 — Splenogramă — hiperimunizare cu virus (MGG ×1 500)



aceea, prez
negativ şi
col., 1974).
pe diferite
iar acestea
efect citot
cată cu a
nule au m
ler = ucig
emis difer
(1978) incl
timică.

Actualm
lui un imp
nelor, exis
tă că de f
lor este c
mocitelor.
l i c h c

Fig. 6 -
imunoco
M — mădu
CS — celul
bursă sau
T; LB — lim
GL — gang
St Ag — sti
T — efect
Ac — antic

aceea, prezintă testul de rozetare E negativ şi EAC pozitiv (Chess şi col., 1974). Cînd anticorpii sînt fixaţi pe diferite celule, ei atrag celulele K iar acestea sînt capabile să exercite un efect citotoxic omorînd celula îmbrăcată cu anticorpi. De aceea celulele nule au mai fost numite celule K (*killer* = ucigaş). Asupra originii lor s-au emis diferite ipoteze; West şi col. (1978) înclină spre a le atribui o origine timică.

Actualmente se atribuie limfocitului un important rol în sinteza globulinelor, existînd opinia cea mai răspîndită că de fapt, sediul sintezei anticorpilor este citoplasma limfocitelor şi plasmocitelor. Dacă Naegeli şi Ehrlich considerau limfocitul ca celulă finală statică non-transformabilă, cercetările din ultimul timp au demonstrat o organizare morfofuncţională cu totul deosebită a limfocitului, asigurînd condiţii optime atît de diferenţiere cît şi de dediferenţiere. Cercetările *in vivo* şi *in vitro* demonstrează multipotenţializarea limfocitului, el reprezentînd şi cel mai mare rezervor al organismului de celule stem sau reticulare nediferenţiate. După cultivarea limfocitelor sanguine stimulate, în maximun 3 zile, se remarcă prezenţa de celule blastice mari nediferenţiate, limfoblastice, plasmoblastice, uneori chiar fibro- şi mieloblastice. Pe baza datelor acumulate pînă acum, se consideră că există două căi prin care limfocitul

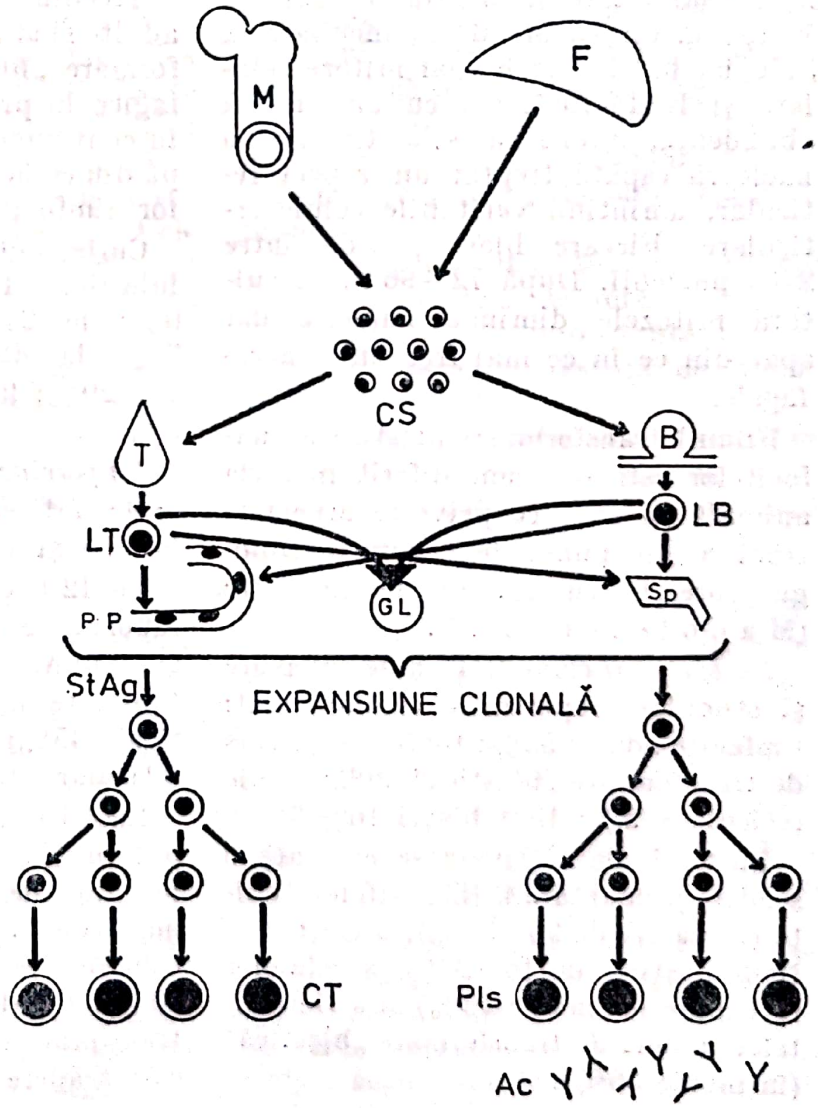


Fig. 6 — Filiaţia celulelor imunocompetente

M — măduvă; *F* — ficat embrionar; *CS* — celule stem; *T* — timus; *B* — bursă sau echivalenţi; *LT* — limfocit *T*; *LB*—limfocit *B*; *PP*—plăci Peyer; *GL* — ganglion limfatic; *Sp* — splină; St Ag— stimul antigenic; *CT* — celule *T* — efectoare; *Pls* — plasmocite; *Ac* — anticorpi

Scanned with OKEN Scanner

poate să asigure existența celulelor hematopoetice care pentru un motiv sau altul au fost distruse. Astfel, limfocitul poate să devină o celulă nediferențiată matcă sau limfocitul fagocitat de un macrofag transferă capacitatea de diferențiere după trecerea printr-un stadiu de celulă matcă. Deci dacă limfocitul din punct de vedere funcțional tezaurizează memoria imunologică, aceasta nu poate să fie localizată decît la nivelul aparatului cromozomal al acestora (fig. 6, foto IV. 16, 17, 18).

Limfocitele hiperbazofile sînt considerate a fi acelea care au fost stimulate de un antigen oarecare.

IV. 2.1. Transformarea blastică „*in vitro*" a limfocitelor

Este una din cele mai importante proprietăți ale acestor celule (B e r c e a n u, 1977).

Fitohemaglutinina P sau M (PHA) și concanavalina A stimulează limfocitele T iar cele B sînt stimulate de polivinil-pirolidon. Stimularea celulelor limfocitare în mediu de cultură începe la cîteva ore de la incubare la 37°C iar la 24 —48 h apar mitoze celulare și limfocite mari cu citoplasmă abundentă, intens bazofilă. Cromatina nucleară capătă treptat un aspect reticular, amintind veritabile celule reticulare. Fiecare blast posedă între 2—3 nucleoli. După 72—96 h, în cultură mitozele diminuă numeric dar apar din ce în ce mai frecvent macrofagele.

Filmul transformării blastice a limfocitelor este oarecum diferit în seria animală în ceea ce privește aspectele celulare din punct de vedere morfologic corelate cu timpul de cultivare (M a n o l e s c u, 1978).

La bovine și ovine la 12 h de cultivare și stimulare raporturile celulare sînt: limfocite adulte 55%; limfocite în curs de transformare „blastică" 30%; celule reticulare 5%; limfoblești 10%."

La 24 h de cultivare se constată o scădere pronunțată a limfocitelor adulte (la valori de 25—35%), o creștere a limfoblaștilor de 15—20%, a celulelor reticulare (în medie 10%) și a limfocitelor în curs de transformare „blastică" (în medie 35%).

Între 24—36 h, valorile nu suferă modificări importante, pentru ca la 48—72 h raportul să se modifice substanțial astfel: limfocite adulte 10—15%; limfocite în curs de transformare „blastică" 20%; limfoblești 50%; celule reticulare 15%.

Începînd cu 96 h în locul limfocitelor adulte și al limfocitelor în curs de transformare „blastică" apar celule macrofagice în procent de 25—35. La 120 h în continuare celulele macrofagice ocupă din ce în ce mai mult locurile celulelor limfocitare.

Curba indicelui de mitoză la 100 celule limfoide se prezintă astfel: 12 h—0%; la 24 h—2—4%; la 36 h—5—8%; la 48 h—10—12%; la 72 h—15—20%; la 96 h—2—3%; la 120 h—0%.

La porcine, se constată o serie de diferențe față de valorile prezentate la bovine și ovine.

La 12 h după cultivare și stimulare raporturile celulare se prezintă după cum urmează: limfocite adulte 30%; limfocite în curs de transformare „blastică" 45%; limfoblești 15%; celule reticulare 10%.

La 24 h de cultivare se constată o puternică scădere a limfocitelor adulte la valori de 5—10%, o creștere mare a numărului de limfoblești (25—30%), a celulelor reticulare (pînă la valori de 20%). Celulele limfocitare în curs de transformare „blastică" recunosc o oarecare scădere (40%).

Scanned with OKEN Scanner

La 36 şi 48 h tabloul celular este cvasi-identic prezentîndu-se astfel: limfocite adulte 2—5%; limfocite în curs de transformare „blastică" 10%; limfoblaşti 65%; celule reticulare 20%.

Cu începere de la 72 h, apar în procent semnificativ, 5—10%, celule macrofagice, care la 96 h şi 120 h reprezintă celulele cele mai frecvente din frotiu. Curba indicelui de mitoză la 100 celule limfoide are următoarea înfăţişare: la 12 h—1—3%; la 24 h—10—12%; la 36 h—15—20%; la 48 h—30—40%; la 72 h—5—10%; la 96 h—0%; la 120 h—0%.

Cabaline. Dintre toate celelalte specii de mamifere, cabalinele au o transformare mai puţin intensă şi mai tardivă. Astfel, la 12 şi 24 h, practic, se găsesc numai limfocite adulte. Începînd cu 36 h de la cultivare şi stimulare elementele celulare se modifică astfel: limfocite adulte 55%; limfocite în curs de transformare „blastică" 25%; limfoblaşti 10%; celule reticulare 10%.

La 48—96 h elementele de mai sus nu suferă modificări cantitative. Cele mai semnificative transformări sînt însă observate la 72 h, raportul dintre celule devenind: limfocite adulte 30%; limfocite în curs de transformare „blastică" 30%; limfoblaşti 20%; celule reticulare 20%.

Modificări nete apar la 120 h cînd se observă şi celule macrofagice. Tabloul celular se prezintă astfel: limfocite adulte 20%; limfocite în curs de transformare „blastică" 10%; limfoblaşti 5%; celule reticulare 30%; macrofage 35%.

Curba indicelui de mitoză la 100 celule limfoide are următoarea configuraţie: la 12 h—0%; la 24 h—0%; la 36 h—5%; la 48 h—5%; la 72 h—20%; la 96 h—15%; la 120 h—2%.

Din datele prezentate rezultă că elementul specie este semnificativ în procesul transformării „blastice" *in vitro* a limfocitelor. Aceste date arată că timpul de blocare a mitozelor limfocitelor cultivate cu colchicină este variabil în funcţie de specie după cum urmează: la bovine-ovine între 65—72 h; la porcine — între 45—50 h şi la cabaline — între 70—80 h.

Plasmocitul derivă din plasmoblast trecînd prin stadiul de proplasmocit şi conţine o cantitate mărită de ARN ribozomal tradusă optic printr-o puternică pironinofilie (bazofilie) caracteristică seriei plasmocitare.

Plasmocitul este o celulă terminală, ireversibilă, represată ca activitate mitotică, ce rezultă din transformarea blastică a unui limfocit B. Morfologic, este o celulă mare, cu o cantitate mai mare de citoplasmă comparativ cu limfocitul. Nucleul are o formă rotundă sau ovală, este aşezat excentric şi are cromatina aşezată sub aspectul caracteristic al spiţelor unei roţi de car. Citoplasma conţine un aparat Golgi bine dezvoltat, ergastoplasmă organizată sub forma a numeroşi saci la suprafaţa cărora se găsesc conglomerate de poliribozomi sub formă de lanţuri, spirale sau rozete. Un număr mare de ribozomi se găsesc şi la suprafaţa membranei nucleare.

După un contact al macroorganismului cu un antigen se înregistrează în limfoganglioni, o importantă plasmocitoză cu secreţie crescută de imunoglobuline specifice.

O creştere semnificativă a numărului de plasmocite, cu scăderea limfocitelor, se înregistrează şi în cazul administrării ACTH sau al terapiei cortizonice.

În citoplasma plasmocitelor, cu ajutorul microscopiei de fluorescenţă sau al feritinei, s-a putut detecta prezenţa anticorpilor.

Citodiferenţierea între plasmocit şi plasmoblast durează în medie 4 zile existînd aproximativ 7 generaţii de celule intermediare avînd o durată de cîte 12 h fiecare (Emil A. Popescu, 1971).

În procesul citodiferenţierii, au loc o serie de restructurări enzimobiochimice. Astfel, nucleul se situează spre periferia celulei. Se dilată aparatul Golgi, scade numărul de mitocondrii

Scanned with OKEN Scanner

și se dezvoltă în mare măsură reticulul endoplasmic rugos.

Plasmocitul este celula anticorpoformatoare, secretorie de IgG, în cea mai mare cantitate și mai puțin de IgA. El nu este prezent în cursul dezvoltării fetale, apărînd de regulă la cîteva zile de la fătare.

Seria macrofago-monocitară. Celulele acestei serii realizează pe cale directă sau indirectă, o bună și eficace defensivă contra diferitelor noxe exterioare, animate sau neanimate. Acest sistem a fost identificat și denumit „sistem reticulo-endotelial" în 1924 de Aschoff. Metchnikoff, încă în 1892, demonstrează existența a două categorii de celule specializate în fagie și anume macrofagele mononucleate și microfagele polinucleate. În 1949, Thomas denumește acest sistem reticulo-histiocitar iar în 1969 Van Furth și Langevort numesc aceste celule ca sistem al fagocitelor mononucleare (Nicoară, 1977).

Besis (1972) arată că acest sistem se compune din: celule fixe reticulare; celule mobile (histiocite) și celule sanguine — monocite mari și mici.

Din punct de vedere al localizării, se găsesc răspîndite atît în organele imunocompetente primare și secundare cît și în aproape totalitatea viscerelor și seroaselor organismului animal.

După Besis (1973) funcțiile principale ale celulelor acestui sistem sînt: antixenică, cyto-caheretică, metabolică, trofică și hematopoetică.

Aceste celule iau naștere din celula stem granulomonocitopoetică în măduva hematoformatoare (Wolkman, Gowans, 1965; Bradely, Metcalf, 1966; Senn, 1967; Harris și Freireich, 1970). Din celula stem ia naștere *monoblastul* ce nu poate fi diferențiat citomorfologic de celula stem. Din monoblast se diferențiază *promonocitul.*

Promonocitul este o celulă de talie mare (20—25 microni), cu raportul nucleocitoplasmatic în favoarea nucleului. Acesta are formă ovală, ușor scobită, cromatina foarte laxă „pieptănată" și fină cu 1—2 nucleoli. Citoplasma este bazofilă, agranulată și cu rare vacuole inconstante. Din această celulă, în măduvă, ia naștere monocitul.

Monocitul are talia cuprinsă între 15—20 microni, cu un raport nucleocitoplasmatic în favoarea citoplasmei. Nucleul este reniform lobat, cu cromatina laxă, fină, ușor „pieptănată", fără nucleoli. Citoplasma este cenușie (culoarea fumului de țigară), avînd inconstant fine granule azurofile. Această celulă nu stă mai mult de 2 h în măduvă și migrează în sîngele periferic incomplet maturizată. De acolo, în 32 h ajunge în țesuturi unde fără a se mai divide se transformă în macrofag. Monocitele au receptori pe suprafața membranei celulare pentru IgG și al treilea component al complementului (Nicoară, 1977). Monocitele au următoarele importante calități:

— capacitatea de fagocitoză și pinocitoză extrem de mare;

— spre deosebire de limfocite ce emit uropode, monocitele care au membrana extrem de ondulată emit pseudopode (foto IV.20).

Histiocitul este o celulă de 12 —14 microni cu nucleul central avînd cromatina nucleară fină „pieptănată" posedînd un nucleol. Citoplasma este relativ abundentă și are o tentă ușor bazofilă.

Celulele acestei serii dau testul citoenzimatic pozitiv la esterazele nespecifice.

Macrofagul are talia cuprinsă între 50—200 microni, cu raportul nucleocitoplasmatic în favoarea citoplasmei. Nucleul este puternic incizat, avînd cromatina intens condensată la periferie, putînd să prezinte 1—2 nucleoli. Citoplasma este cenușie, are granule mari și vacuole (foto IV. 10, 19).

Macrofagul pinocitează și transformă parțial fiecare antigen prin cuplarea cu un ARN macrofagic. Această operațiune permite macrofagului să pre-

Scanned with OKEN Scanner

zinte noua informaţie antigenică spre noi prelucrări atît limfocitelor „T" cît şi limfocitelor „B". În funcţie de necesităţi, va funcţiona numai o linie „tehnologică" de producere a răspunsului imun sau vor funcţiona ambele linii „tehnologice" (B şi T), conform descrierii dinamicii răspunsului imun din capitolele următoare.

Mastocitul. Este o celulă mezenchimală larg răspîndită în organism şi care are implicaţii imunologice în elaborarea răspunsului de tip reaginic. Mastocitul este o celulă cu diametrul cuprins între 10—14 microni, are un nucleu segmentat mai puţin vizibil, o citoplasmă acidofilă plină cu granulaţii (ce acoperă şi nucleulm) etacromatic după colorare cu albastru de toluidină. Această celulă produce serotonină, histamină, heparină şi IgE. Un element demn de a fi subliniat este că diferenţa între populaţia mastocitară adultă faţă de una blastică se face prin aceea că „citul" produce histamină iar „blastul" nu o produce. Electronooptic se remarcă prezenţa de granule ce au o mărime cuprinsă între 75—135 nm; acestea sînt de două feluri: unele fin granulate, iar altele etalează o structură lamelar-concentrică. Are un reticul endoplasmatic rugos, un aparat Golgi bine dezvoltat, dar mitocondriile şi ribozomii sînt într-un număr redus (foto IV. 12).

IV. 2.2. Detalii ultrastructurale ale celulelor imunocompetente evidenţiate prin microscopie electronică (microscopie în scanning şi în transmisie)

a) **Microscopia în „scanning".** Microscopia electronică în baleiaj (SEM) oferă posibilitatea explorării şi aprecierii suprafeţelor celulare în imagini tridimensionale. Acest fel de examinare permite să se facă studii asupra modificărilor membranei celulare, care faţă de aspectul normal în diferite stări patologice prezintă modificări importante pentru diagnostic.

Limfoblaştii „T" reprezintă capii de serie ai liniei limfoide avînd o talie cuprinsă între 20—25 microni; sînt elemente rotunde avînd pe suprafaţă butoni foarte rari şi puţin exprimaţi, cea mai mare parte a suprafeţei fiind netedă sau uşor crenelată. În seria animală (M a n o l e s c u, 1979) la nivelul sîngelui periferic, procentul cel mai mare de limfoblaste „T" îl posedă păsările.

Prolimfocitele „T" sînt elemente de filiaţiune rezultate prin diviziunea limfoblaştilor „T" şi posedă caractere intermediare între aceştia din urmă şi limfocitele adulte. Au o talie cuprinsă între 15—20 microni, sînt perfect rotunde, iar pe suprafaţa celulară prezintă butoni mai frecvenţi, dar mai mici ca mărime. În seria animală, procentul cel mai mare de prolimfocite „T" pare a fi tot la păsări (8%) faţă de cabaline (2%).

Limfocite adulte „T" reprezintă faza terminală, dar de rezervă a liniei limfocitare „T" şi apar prin maturarea prolimfocitelor. Sînt elemente rotunde, avînd talia cuprinsă între 10—20 microni. Suprafaţa celulară prezintă un număr mare de butoni de mărimi diferite lăsînd numai mici spaţii netede. În stare normală, aceste elemente predomină numeric în sîngele periferic într-un raport de 4/1—6/1 cu limfocitele „B".

Frecvenţa cea mai mare o înregistrează omul cu 83,57% iar cea mai mică păsările cu 75,39%.

Celulele limfocitare „B" au o frecvenţă mult mai mică în sîngele periferic decît limfocitele „T".

Limfoblaştii „B" sînt capii de serie ai grupului de limfocite „B". Apar ca elemente rotunde sau uşor tasate avînd o mărime de 20—25 microni. Caracteristic pentru aceste celule din punctul

Scanned with OKEN Scanner

de vedere al citoarhitecturii de exterior este prezenţa microvililor scurţi, groşi şi rar dispuşi cu variaţii relativ mari în funcţie de specie şi evoluţie. Astfel, la cal se observă microvilii cei mai scurţi şi mai groşi, la bovine microvilii cei mai subţiri şi mai deşi, iar la porc o situaţie intermediară. În seria animală frecvenţa cea mai mare a limfoblaştilor „B" există la păsări (0,09%).

Prolimfocitele „B" sînt elemente de filiaţiune rezultate prin diviziunea limfoblaştilor „B" şi posedă caractere intermediare între aceştia şi limfocitele adulte. Au o talie cuprinsă între 15—20 microni, sînt perfect rotunde, iar suprafaţa celulară este în mare parte asemănătoare cu cea a limfoblaştilor „B".

În seria animală, frecvenţa lor cea mai ridicată se întîlneşte la cabaline (1,5%). Aceste date procentuale au fost comparate şi cu rezultatele testului specific de rozetare EAC.

Limfocite adulte „B" sînt rezultatul maturării prolimfocitelor. Sînt stimulate *in vitro* cu polivinil-pirolidonul pentru efectuarea transformării blastice specifice. Sînt elemente rotunde, cu talia cuprinsă între 10—20 microni. Suprafaţa celulară (ca o caracteristică majoră) este acoperită de o mare cantitate de microvili relativ fini sau mai groşi în funcţie de etapa de maturare şi de specie. Frecvenţa acestora în seria animală este mai ridicată la păsări (12,5%) şi mai redusă la ovine (7,5%). În cadrul acestor imagini tridimensionale a limfocitelor adulte se înscriu (dar se diferenţiază după alte criterii) şi limfocitele K (killer) cît şi cele N (nule).

Monoblastele şi histioblastele sînt celule cap de serie ale liniei histiomonocitare. Sînt elemente de talie mare, cuprinsă între 25—30 microni, de formă uşor cuboidală avînd pe suprafaţa celulară mici mantii care se răsfrîng dînd o imagine extrem de caracteristică (membrană ondulată). Frecvenţa lor în sîngele periferic este foarte redusă (între 0,01% şi 0,07% la ovine).

Histiocitele au o talie mai mică decît precedentele, cuprinsă între 24—28 microni. Sînt celule mai rotunde avînd suprafaţa puternic festonată de întretăierea şi suprapunerea mai multor mantii. Provin din maturarea incompletă a monoblastelor şi au o frecvenţă în sîngele periferic cuprinsă între 0,5% la păsări şi 2,0% la bovine.

Monocitele sînt celule apropiate ca aspect de histiocite diferenţiindu-se de ele numai prin talia celulară care este cuprinsă între 20—25 microni. Frecvenţa în seria animală este variabilă între 5,0% la ovine şi 1,0% la păsări.

Histiocitele macrofagice reprezintă unele dintre cele mai importante celule pentru sistemul de apărare a organismului. Sînt celule de talie mare cuprinsă între 26—30 microni, fiind plină de neregularităţi pe suprafaţă avînd şi o serie de prelungiri citoplasmatice, probabil cu un important rol imunologic. În seria animală nu prezintă diferenţieri notabile.

b) **Microscopia în transmisie** oferă posibilitatea studierii celulelor din punctul de vedere al infrastructurii lor. În acest fel se pot decela primele modificări ale organitelor celulare care se produc cu mult timp înaintea modificărilor observate în microscopie optică.

Celula reticulară are un nucleu uşor festonat cu cromatina dispusă lax, uşor edematoasă, citoplasma cu multiple prelungiri are un număr relativ redus de mitocondrii de mărime mică, un aparat Golgi slab vizibil, fibre reticulare, sub formă de filamente şi microfibrile, un reticul endoplasmatic neted foarte bine dezvoltat cît şi schiţe rare de reticul endoplasmatic rugos.

Germinoblastul are un nucleu relativ rotund cu cromatina laxă avînd 2 nucleoli giganţi. În citoplasmă, există o cantitate apreciabilă de ribozomi şi polizomi, frecvente mitocondrii de mărime mică şi un reticul endoplasmatic rugos slab vizualizat.

Scanned with OKEN Scanner

Limfoblastul are un nucleu în general ușor crenelat cu cromatină de tip oxi dominantă, dar și cromatina este în cantitate mai mare decît la celelalte două celule mai sus descrise și un nucleu gigant. În citoplasmă, există o cantitate mare de poliribozomi, puține mitocondrii de mică mărime, corpi denși din loc în loc, un redus reticul endoplasmatic rugos și schițe slabe ale aparatului Golgi și ale centriolilor.

Limfocitul. Nucleul conține o mare cantitate de bazicromatină avînd o formă ușor crenelată. Citoplasma este plină de ribozomi, rare mitocondrii, granule aurofile, un aparat Golgi la limita vizibilității. Reticulul endoplasmatic și aparatul lizozomal sînt foarte slab exprimate.

Plasmoblastul are o citoplasmă largă cu o cantitate relativ mare de reticul rugos endoplasmatic, rari ribozomi, un aparat Golgi bine evidențiat. Mitocondriile sînt de mărime mai mare decît la elementele celulare limfoide. Nucleul este ușor excentric, avînd o cantitate mare de oxicromatină și un nucleol.

Plasmocitul. Nucleul este excentric, fără nucleoli, cu cromatină bazofilă dispusă la periferie ca spițe de roată. Toată citoplasma este ocupată de un bogat reticul rugos endoplasmatic cu frecvente dilatații de tip cisterne. Are un aparat Golgi foarte dezvoltat și cu vezicule Golgi. Mitocondriile sînt reduse numeric.

Cînd cantitatea de imunoglobuline secretată în citoplasma plasmocitului de către reticulul endoplasmatic rugos depășește anumite limite și se formează adevărate „lacuri" de acumulare a secreției, celula plasmocitară se transformă în celulă Mott, hipersecretorie.

Eozinofilul are nucleul subțire și segmentat cu o cantitate mare de bazicromatină. În citoplasmă, se află rare mitocondrii, un aparat Golgi și rare elemente ribozomale precum și formațiuni ale reticulului endoplasmatic rugos.

Citoplasma este plină de granule eozinofile ce apar ca discuri biconvexe cu o bandă electronoopacă centrală.

Mastocitul are un aspect particular cu largi pseudopode. În citoplasmă, aparatul Golgi și reticulul endoplasmatic rugos sînt puțin vizibile și la fel mitocondriile. Granulele electronoopace au o membrană de separare și la interior un material amorf.

Macrofagul. Elementele caracteristice ale acestei celule sînt prezența numeroșilor corpi denși, fini granulați care sînt componentele aparatului lizozomal (foto IV. 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32).

IV. 3. Morfologia sistemului celular al imunității în reacțiile imune și hiperimune

IV. 3.1. Morfologia S.C.I. în reacțiile imune*

Inocularea unui antigen este urmată la diferite intervale (în funcție de natura antigenului și specia animalului) de o succesiune de modificări citomorfologice în organele specializate în elaborarea răspunsului imun. Într-o primă etapă, aceste modificări realizează pregătirea celulelor imunocompetente; în continuare, la 7—14 zile după inoculare, începe și se accentuează treptat biosinteza de anticorpi specifici față de antigenul inoculat. În cursul instalării imunității, s-au constatat modificări citomorfologice ale S.C.I. variabile în caz de monovaccinări sau polivaccinări.

* Datele se referă la specia porcină

Scanned with OKEN Scanner

Măduva hematoformatorie este teritoriul cel mai puţin modificat, indiferent dacă este vorba de un singur antigen sau mai multe antigene inoculate simultan. Astfel, se remarcă o scădere a elementelor liniei celulare eritropoetice şi o creştere puţin semnificativă a liniilor celulare monocitopoetice, limfopoetice şi reticulare. Sistemul mielopoetic nu comportă, de regulă, variaţii cantitative faţă de normal.

Timusul este ceva mai mult afectat în sensul că la organismele tinere cînd s-a inoculat un vaccin sau, concomitent, mai multe antigene, se remarcă o hiperplazie a celulelor reticulare şi limfoblastice, fără a se putea distinge şi alte modificări notabile. Aceste două teritorii nu recunosc prezenţa unor diferenţieri limfoplasmocitare.

În *amigdală* se remarcă o activitate intensă tradusă printr-o puternică proliferare reticulară şi limfoblastică cu o importantă diferenţiere plasmoblastico-plasmocitară, care în unele situaţii poate ajunge la o frecvenţă de 25—30% din totalul elementelor celulare, fără a se putea identifica diferenţe în reacţiile determinate de inocularea unuia sau mai multor antigene. Se remarcă prezenţa unui important număr de celule macrofagice care uneori pot reprezenta 5—8% din totalul celulelor.

În *splină* şi *limfoganglioni*, au loc cele mai precoce şi intense modificări citomorfologice după inocularea de antigen sau antigene.

A. **În cazul inocularii unui singur vaccin.** *Celulele reticulare* sînt primele care reacţionează încă de la 48 h; manifestă o proliferare care atinge nivelul maxim la 3—4 zile de la inocularea antigenului (cu valori de 2—3 ori mai mari faţă de normal). După 4 zile, numărul lor scade cu repeziciune ajungînd iarăşi la valori normale cam între ziua a 6—7 a de la inoculare.

Celulele germinoblastice reacţionează în sens proliferativ imediat după celulele reticulare atingînd după 4—5 zile valorile maxime (de 3—4 ori mai mari faţă de starea normală); scăderea numărului acestora nu mai are loc la fel de rapid ca în cazul celulelor reticulare ci mult mai lent, revenirea la normal observîndu-se după 11—12 zile de la inoculare.

Limfoblaştii proliferează din aceeaşi dinamică cu germinoblaştii; la unele celule se constată o diferenţiere, în sensul apariţiei unei hiperbazofilii citoplasmatice. Aceste celule reprezintă imunoblaştii care nu provin din germinoblaşti, ci apar în urma contactului antigenului cu limfocitul mic urmată de dediferenţierea acestuia (transformare „blastică"). Raportul dintre limfoblaşti şi imunoblaşti este de 1/3.

Limfocitele, de regulă, scad numericeşte începînd cu ziua a treia, ating valori maxime spre ziua a 6—7-a şi revin la valorile normale între 13—14 zile de la inoculare. Elementul important este acela că cea mai mare parte (în raport de 1/5) dintre limfocite devin hiperbazofile în urma contactului cu antigenul (imunocite).

Macrofagele sînt celule de cea mai mare importanţă în declanşarea procesului imun; ele cresc numericeşte în mare măsură (de 4—5 ×) faţă de normal între ziua a 2-a — 4-a de la inoculare, scăzînd apoi rapid spre valorile normale între a 5-a — 6-a zi de la inocularea antigenului.

Plasmoblaşti-plasmocite sînt celulele care efectuează „de facto" reacţia imună umorală prin elaborarea imunoglobulinelor specifice antigenului inoculat (anticorpi specifici). Elementele plasmocitare apar în procente mici (3—5%) încă din ziua a 5-a de la inoculare, ajungînd în ziua a 7-a la plafonul maxim de 30—40%; urmează un platou pînă la ziua a 10-a şi o scădere masivă, pentru ca în ziua a 14-a să atingă valorile minimale.

B. **În situaţia inocularii simultane cu mai multe antigene** se constată unele diferenţe în tipul de reacţie a S.C.I. Astfel, dacă în cazul monovaccinării reacţia celulară durează în medie 14 zile, în cazul polivaccinărilor perioada este mai lungă (circa 21 zile).

Scanned with OKEN Scanner

Dacă debutul procesului imunologic, începînd cu proliferarea celulelor reticulare, are loc în cazul monovaccinării între 2—4 zile, în cazul polivaccinării primele reacţii se înregistrează între 3—7 zile, deci mai puţin precoce, dar avînd o evoluţie mult mai lungă; aceste elemente explică dealtfel curba plasmocitozei şi durata mai mare a acestui tip reacţional.

În cazul monovaccinării, elementele celulare plasmoblasto-plasmocitare apar între 5—7 zile, cu un nivel maxim în ziua a 7-a—10-a; în cazul polivaccinării, aceste elemente apar între 8—10 zile avînd o intensitate maximă între 10—15 zile.

Elementele macrofagice prezintă, de asemenea, unele diferenţe; în cazul monovaccinărilor ele apar şi se menţin în proporţie ridicată timp de 2—4 zile de la inocul, în timp ce în cazul polivaccinărilor apar de asemenea începînd cu ziua a 2-a dar se menţin în procent ridicat pînă spre ziua a 7-a — 8-a.

Elementele de mai sus atestă că o polivaccinare este avantajoasă pentru organismul animal după cum indică tipul celular de reacţie al S.C.I.

Elementele celulare angajate în răspunsul imun umoral şi celular pot fi bine individualizate în teritoriul S.C.I. prin folosirea coloraţiei cu acridinoranj (AO). Valorile relative ale imunogramei, în cazul porcilor vaccinaţi antipestos (M a n o l e s c u şi col., 1976) sînt prezentate în tabelul IV. 1.

Sîngele periferic. Diferenţele semnalate în teritoriul limfosplenic al S.C.I. referitor la mono- şi polivaccinări sînt prezente şi în sîngele periferic (foto IV. 33, 34, 35). Aspectele mai jos redate, valabile pentru monovaccinări, permit alcătuirea imunoleucogramei (pe baza cercetării leucocitoconcentratului), care înlocuieşte astfel vechea „formulă leucocitară".

Analizînd fiecare element celular din leucocitoconcentrat se constată următoarele:

— *granulocite*, care în mod normal sînt în proporţie de 55—60%, ajung încă din ziua I după inoculare la 28—30%, înregistrînd un maxim de scădere în ziua a 8—9 -a (de 3—8%). Revenirea la normal are loc spre ziua 14-a;

Tabelul IV.1.

Valorile procentuale ale imunoleucogramei la porci vaccinaţi contra pestei

Examen după vaccinare în zile	Imuno leucograma								
	Granulocite	Monocite	Cel. reticulare	Limfocite	Celule imunologic active				Celule A.R.N. — AO
					Imunoblaste	Imunocite	Plasmoblaste	Plasmocite	
Normal (înainte de vaccinare)	55—60	3—6	0,5—1	25—30	0	0	0	0	0—1
I	28—30	9—10	9	49—52	0	0	0	0	0
III	8—15	0	40—50	12—15	10	30	0	0	60
IV	8—20	4—5	15—25	30—40	15	15	0	0	30
V	22—30	4—5	10—11	37—40	7	20	0	0	30
VI	20—30	4—5	8—10	40—45	5	25	0	0	35
VII	10—12	0	15	45—50	10	20	0	0	30
VIII	5—8	0	3—4	60—70	10	15	0	0	25
IX	3—5	0	20—25	45—50	10	25	0	0	30
X	10—15	3	5—8	50—55	5	25	0	0	30
XI	15—18	2—3	0,5—1	55—60	5	15	0	0	20
XIV	55—60	4—5	0,5	35—40	0	0	0	0	10

Scanned with OKEN Scanner

— *monocitele* care în mod normal oscilează între 3—6% dispar complet între zilele a 7—9-a de la inoculare pentru ca să revină la normal spre ziua a 11—14-a;

— *celule reticulare*, prezente în stare normală în proporţie de 0,5—1%, înregistrează o proliferare maximă de 40—50% începînd din ziua a III-a, iar revenirea la normal are loc spre ziua a 11-a;

— *limfocitele* variază în stare normală între 25—30%. În timpul reacţiei imune numărul de limfocite se menţine, de regulă, în limite normale;

— *imunoblaştii* sînt celule care nu apar în sînge în stare normală. În cursul imunizării, ele apar în proporţie de maximum 10—15% începînd din ziua a 3-a şi dispar spre ziua a 14-a;

— *imunocitele* nu se găsesc în stare normală; apar în cursul imunizării în ziua 1; proporţia maximă, de 30%, se constată în ziua a 3-a, pentru a dispare în ziua a 14-a.

În cursul imunizării nu apar plasmoblaşti şi plasmocite.

Pe parcursul imunizării cu mai multe antigene apar diferenţe descrise în teritoriul limfo-ganglionar şi splenic, iar în sîngele periferic apar celule plasmoblastico-plasmocitare în procent mic (3—5%) între zilele 6—10 de la imunizare (M a n o l e s c u şi col., 1979) (foto IV. 36, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60).

IV. 3.2. Morfologia S.C.I. în reacţiile hiperimune

În cursul hiperimunizării au fost identificate diferenţe de reactivitate în teritoriile S.C.I. în funcţie de tipul de antigen. Astfel, cele trei stări reacţionale se grupează astfel:

Reacţii caracteristice hiperimunizării cu antigene bacteriene corpusculare. Un element comun al acestei stări este reprezentat de existenţa în toate organele componente al S.C.I. a celulelor granulocitare atît de tipul neutrofilic cît şi eozinofilic, într-un număr mult mai mare în comparaţie cu valorile normale. Principalele modificări constatate la caii hiperimunizaţi cu antigene bacteriene ca *Erysipelothrix rhusiopathiae* şi *Escherichia coli* sînt prezentate în continuare (M a n o l e s c u şi col., 1974, 1975).

Măduva hematoformatorie. Se remarcă o importantă hiperplazie a sistemului celular mielocitar, cu predominenţa elementelor mature (granulocite neutrofile şi eozinofilice) şi semimature (metamielocite) neutrofilice şi eozinofilice. În acest teritoriu, pot apărea şi semne evidente de anemie în cazul sîngerărilor repetate, traduse prin existenţa unui număr mare de celule bazofilice de tip eritroblastic şi prin scăderea în mare măsură a numărului de eritroblaste policromatofile şi acidofile.

Limfoganglioni. Se constată o reacţie importantă pe fondul creşterii numărului de celule germinoblastice şi limfoblastice dar fără a modifica morfostructura organică; în spaţiile pericordonale şi în medulară se găsesc, în număr mare, granulocite eozinofile şi neutrofile. Diferenţierea celulară pe linie plasmocitară este evidentă dar nu atît de puternică ca în cazul hiperimunizării cu toxine bacteriene sau virusuri.

Splină. Pulpa roşie este hipoplazică şi puternic infiltrată cu celule eozinofile. Pulpa albă îmbracă aspecte diferite, de la o aplazie pronunţată pînă la imagini de puternică hiperplazie pe fondul celulelor reticulare şi limfoblastice cu pronunţată diferenţiere pe linie plasmoblasto-plasmocitară. La acest nivel, o modificare importantă, situată în teritoriul vascular, este exprimată printr-o scleroză periadventicială cu mari depuneri de mucopolizaharide neutre.

Tehnica de evidenţiere a acizilor nucleici în lumină ultravioletă după

Scanned with OKEN Scanner

colorare cu acridin-oranj (AO) indică o frecvenţă crescută a celulelor cu citoplasma roşu-flacără, active din punct de vedere al sintezei proteinelor. Frecvenţa acestora este cuprinsă între 20—35% din totalul de celule.

Sîngele periferic pe leucocitoconcentrat. Modificările acestui teritoriu faţă de aspectul valoric normal sînt importante dar nu ajung niciodată la nivelul celor produse de antigene virale sau bacteriene toxice. Acestea se traduc prin creşterea procentului de celule limfoplasmocitare pe deoparte, iar pe de alta, prin creşterea valorilor celulelor mielocitare de tip neutrofilic şi eozinofilic. Creşterea numerică a celulelor din aceste clase celulare se face de regulă într-o proporţie suplimentară de 25—50% (foto IV 41, 43, 62).

Reacţii caracteristice hiperimunizării cu antigene de tipul toxinelor bacteriene. În cazul acestor antigene caracteristica majoră a modificărilor în teritoriile S.C.I. este reprezentată de o puternică proliferare limfo-reticulară, cu diferenţiere plasmocitară, în absenţa oricărei reacţii mielocitare. Aspectele descrise în astfel de situaţii se referă la caii hiperimunizaţi cu toxine clostridiene (Manolescu şi col., 1973, 1975).

Măduva hematoformatorie. În acest teritoriu se remarcă o intensă hiperplazie a sistemului celular reticulolimfocitar. Aceste celule au o frecvenţă mult crescută (în medie de 3—4 ori faţă de normal). Consecinţa este o importantă descreştere a valorilor celorlalte serii celulare medulare (mielo- şi eritropoetice alături de cea monocitară).

Limfoganglioni. Se remarcă o puternică hiperplazie a centrilor germinativi, cu sporirea numărului celulelor reticulare (germinoblastice) şi limfoblastice, o creştere importantă a celulelor limfoplasmocitare în sinusurile perifoliculare şi o reacţie de tip plasmoblastoplasmocitar (alături de imunocite şi imunoblaşti) în zona medulară (foto IV. 61, 64, 65, 66).

Splină. Pulpa roşie este hiperplazică, avînd o intensă amiloidoză. Pulpa albă prezintă o hiperplazie a foliculilor splenici pe fond celular limfohistiocitar, însoţită de o intensă reticuloză. Se identifică de asemenea o diferenţiere plasmoblasto-plasmocitară. Celulele germinoblastice au în citoplasmă mucopolizaharide neutre. Teritoriul vascular arată modificări de tipul endarteritei obliterante sau panvasculitei cu hialinoză, fibrinoid amiloid, cu mucopolizaharide neutre în intimă şi acide în adventice.

Colorarea cu acridin-oranj pentru acizii nucleici arată existenţa A.R.N.-roşu flacără în citoplasma celulelor S.C.I. (în medie 30—55%) (foto IV. 53, 54, 55, 66).

Ficatul este sediul unor grave modificări de tipul unei hepatite imune. Se disting atît focare nodulare în spaţiul Kiernan cît şi infiltraţii difuze între cordoanele Remack cît şi în spaţiile Disse cu celule de tip reticular, imunoblastic, imunocitar, plasmoblastic şi plasmocitar (foto IV 38, 39, 42, 44).

Rinichii îmbracă tabloul unei nefrite imune caracterizată de infiltraţii nodulare rar difuze de celule reticulare, imunoblastice, imunocitare, plasmoblastice şi plasmocitare. Aceste leziuni în cazul calului creează dificultăţi de diagnostic diferenţial faţă de A.I.E., iar în cazul porcului faţă de complexul leucozic (foto IV. 40, 47, 48, 68).

Sîngele periferic. Pe leucocitoconcentrat se constată că sistemul limfoid (imunocite şi imunoblaste) domină procentual (75—80%) iar frecvenţa celorlalte celule sanguine este mult redusă. Rar pot să apară celule plasmocitare; nu se observă nici o reacţie pe linia celulelor reticulare, histiocitare şi monocitare (foto IV. 67).

Reacţii în cursul hiperimunizării cu antigene virale. Modelul experimental realizat în scopul demonstrării reacţiilor morfologice în procesul hiperimunizării cu antigene virale este constituit de inocularea repetată la porcine a virusului pestos (Manolescu şi col., 1976) (tabelul IV.2).

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul IV.2

Aspectele imunoleucogramei la porcii hiperimunizaţi cu virusul pestos

Examen după hiperimunizare în zile	Imunoleucograma								
	Granulocite	Monocite	Celule reticulare	Limfocite	Celule imunologic active				Celule ARN — AO
					Imunoblaşti	Imunocite	Plasmoblaşti	Plasmocite	
Normal (înainte de inoculare)	55—60	3—6	3—4	25—30	0	0	0	0	0—1
II	90	2	0	8	0	0	0	0	0
III	54	2	7	9	6	22	0	0	28
IV	32	2	12	4	11	29	5	5	50
V	6	4	12	31	13	23	4	7	40
VI	5	0	12	27	12	31	5	8	48
VII	30	0	12	2	13	33	6	4	43
VIII	8	0	12	31	16	20	4	9	49
IX	22	0	12	12	11	25	9	9	54
— Presingerare —									
X	75	3	0	22	0	0	0	0	3—5
— După singerarea parţială la 2 ore									
X	10	0	20	70	0	0	0	0	10
XI	15	5	10	24	5	20	12	9	46
XII	10	0	43	15	5	15	5	7	35
XIII	7	0	50	1	5	15	7	5	57
XIV	15	2	8	75	0	0	0	0	25
— Presingerare —									
XV	60	0	2	35	0	3	0	0	20
— După singerarea parţială a II-a, la 2 ore									
XV	15	0	15	58	0	12	0	0	40
XVI	20	2	18	50	0	10	0	0	35
— Reinoculare cu virus									
XVII	45	2	15	24	0	10	2	2	20
XVIII	8	0	15	45	0	20	6	6	32
XIX	12	0	10	50	10	10	3	5	28
— Presingerarea a III-a									
XX	25	0	15	43	0	10	2	5	17
— După singerarea parţială a III-a, la 2 ore									
XX	4	0	20	31	15	30	0	0	45
XXI	5	0	5	70	0	20	0	0	20
XXII	75	0	2	23	0	0	0	0	5
XXIV	45	3	2	50	0	0	0	0	7
XXV	75	0	0	25	0	0	0	0	3
XXVII	60	0	0	40	0	0	0	0	2
XXXI	65	0	0	35	0	0	0	0	4
XXXII	50	0	0	50	0	0	0	0	1
XXXII	12	0	18	60	0	10	0	0	15
XXXIII	10	0	15	40	10	25	0	0	40
XXXVIII	70	0	0	30	0	0	0	0	1
XXXVIII	7	0	25	50	8	10	0	0	20

Scanned with OKEN Scanner

Sîngele periferic studiat tot cu ajutorul leucocitoconcentratului a arătat un element important și neobișnuit: prezența plasmoblaștilor și plasmocitelor (în procent de 10—15) și a celulelor reticulare stem cu potențial limfocitar sau chiar a celulelor reticulare primordiale. Acest tablou apare după a 4-a zi de la prima inoculare a virusului. Revenirea la normal (în caz că numai survine nici o reinoculare cu virus) se produce aproximativ în ziua a 24-a. În cazul reinoculării antigenului viral, normalizarea apare abia spre ziua a 38-a.

Considerăm că cel mai important element al reacțiilor hiperimune este modificarea de tip pseudoleucemic a sîngelui periferic care poate crea mari dificultăți de interpretare. Singura modalitate de diagnostic diferențial îl constituie studierea medulogramei care nu atestă modificări de tip proliferativ și deci reacția bănuită inițial de a fi de tip leucemic se interpretează ca o reacție pseudoleucemică.

Măduva hematoformatorie. În cazul hiperimunizării cu virus viu acest teritoriu important al hematopoezei nu se solidarizează la un răspuns intens așa cum apare în sînge, splină, limfoganglioni ci are o singură și nesemnificativă reacție de discretă hiperplazie limforeticulară.

Splină. În acest teritoriu se produc cele mai importante leziuni fapt care explică în cea mai mare măsură și aspectele oferite de sîngele periferic. Reacția în pulpa albă și roșie este sinergică, constînd din o hiperplazie a celulelor reticulare și germinoblastice, alături de o intensă diferențiere a acestora pe linia plasmoblastoplasmocitară. În splenogramă, aceste celule ajung pînă la 20—30% celule reticulare și 40—55% celule aparținînd liniei plasmocitare. Teritoriul vascular nu se modifică deoarece răspunsul celular în urma inocularii de virusuri vii durează un timp scurt pe cîtă vreme o hiperimunizare cu toxine bacteriene sau corpusculi bacterieni poate dura mai multe cicluri de mai mulți ani, existînd deci timpul necesar pentru apariția leziunilor degenerative în teritoriul vascular.

Limfoganglionii. Acest teritoriu recunoaște în linii mari aceleași modificări ca cel splenic: hiperplazia pronunțată a centrilor germinativi pe fondul creșterii numărului de germinoblești și limfoblești, îndoparea pronunțată a spațiilor pericordonale cu plasmoblești și plasmocite precum și prezența acestora în număr mare în zona medulară. Un element important, demn de a fi semnalat, este acela că peste 85% din populația de limfocite și limfoblești apare cu citoplasma extrem de bazofilă ceea ce practic permite a-i încadra în categoria imunocitelor și imunoblaștilor. Colorația cu AO indică prezența A.R.N. roșu-flacără citoplasmatic într-un procent de peste 80% din totalul populației limfocitare și plasmocitare din splină, limfoganglioni și sîngele periferic.

Cunoașterea acestor fenomene poate explica mai bine provenienta celulelor reticulare și plasmocitare sanguine în teritoriile limfoganglionare și splenice ale S.C.I. O mențiune importantă din punct de vedere fundamental dar mai ales practic (pentru diagnosticul leucemiilor) se referă la faptul că atît în imunizarea simplă cît și în hiperimunizare, studiul sîngelui periferic nu arată modificarea raportului normal și cunoscut al limfocitelor „T"/„B"= =4,5/1.

IV. 4. Dinamica răspunsului imun

Migrarea antigenului în organism. O primă condiție pentru ca antigenul să determine un răspuns imun este ajungerea lui în contact nemijlocit cu celulele imunocompetente.

O a doua condiție este aceea ca el să

Scanned with OKEN Scanner

aibă un grad de remanenţă capabil de a asigura un stimul suficient de îndelungat necesar elaborării răspunsului imun. Gradul de remanenţă este direct corelat cu viteza de dregradare a antigenului exprimată sub formă de timp de înjumătăţire (T 1/2).

Atît circuitul antigenelor în diferite ţesuturi şi organe, cît şi timpul de înjumătăţire au putut fi urmărite prin marcarea lor cu izotopi radioactivi. În acest scop, se preferă izotopii care emit radiaţii beta, mai puţin penetrante, care se ataşează de grupări chimice cu un grad cît mai mare de stabilitate şi nereutilizabile de către organism. O astfel de combinaţie cu care s-au obţinut bune rezultate este gruparea tirozil marcată cu iod radioactiv.

Urmărind prin astfel de metode circuitul antigenelor în organism, s-a constatat o concentrare a lor la nivelul organelor limfoide. Localizarea lor este şi într-o anumită corelaţie cu calea de inoculare. În cazul inocularii subcutanate, se constată prezenţa antigenelor în ganglionii limfatici începînd cu cei aferenţi locului de inoculare în zona macrofagelor medulare şi a foliculilor limfoizi.

După inocularea intravenoasă, concentraţia cea mai mare de antigen se realizează în zona marginală şi în foliculii limfoizi ai splinei. Această repartiţie topografică a antigenelor este în concordanţă cu bogăţia în celule imunocompetente a organelor menţionate.

Din punct de vedere al timpului de înjumătăţire, antigenele pot fi împărţite în două categorii: cu T 1/2 lung şi T 1/2 scurt. În prima categorie se încadrează albumina şi IgG; în a doua antigenele corpusculare, flagelina şi polipeptidele sintetice.

Diminuarea cantitativă a antigenului, înjumătăţirea şi eliminarea lui completă se desfăşoară în 3 faze (după D o i n a O n i c ă, 1977):

— faza de echilibru, corespunzătoare distribuţiei antigenului între spaţiul intra şi extravascular;

— faza de eliminare lentă, în care are loc catabolizarea antigenului sub formă liberă;

— faza de eliminare rapidă datorită apariţiei anticorpilor specifici şi a constituirii complexelor antigen-anticorp, urmată de fagocitarea acestora.

În faza a treia se constată o sensibilă diferenţă între antigenele omoloage şi heteroloage, acestea din urmă eliminîndu-se mai repede.

Recunoaşterea imunologică. Prima condiţie pentru dezvoltarea unui răspuns este recunoaşterea calităţii de non self a antigenului.

Recunoaşterea implică mai multe niveluri, corespunzătoare treptelor filogenetice pe care se situează grupa de vieţuitoare care reacţionează faţă de non self.

Forma cea mai rudimentară de recunoaştere este cea metabolică, prezentă începînd cu cele mai simple vieţuitoare. Ea se referă la capacitatea discriminatorie, existentă deja la organismele unicelulare, compuşii chimici sau structurile corpusculare din mediu, în funcţie de nevoile nutritive. Rezultatul acestui tip de recunoaştere poate fi acceptarea non selfului prin endocitare şi metabolizare sau respingerea acestuia în cazul că nu este necesar sau cînd este nociv pentru celulă.

Forme de recunoaştere superioare celei metabolice apar la organismele pluricelulare. Una din ele este recunoaşterea în urma contactului intercelular şi recunoaşterea la nivel fagocitar, care are ca urmare fagocitoza sau pinocitoza non selfului. Aceste procese care intervin aşa cum s-a arătat deja atît în mecanismele imunităţii naturale, cît şi în cele ale imunităţii dobîndite (inductibile) sînt lipsite de specificitate în sensul că în primele două faze nu fac o discriminare între non selful antigenic de cel neantigenic. Numai în faza de digestie macrofagele degradează incomplet non selful în cazul cînd acesta are proprietăţi antigenice.

Recunoaşterea imunologică este forma cea mai evoluată de recunoaştere şi

Scanned with OKEN Scanner

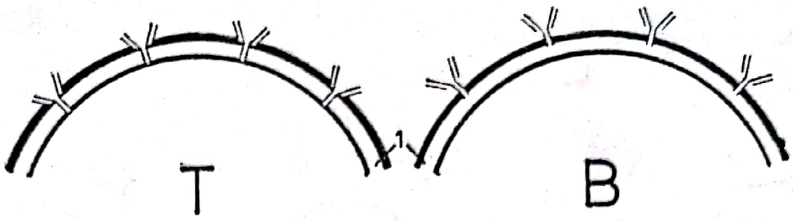


Fig. 7 — Poziția receptorilor Ig pe suprafața limfocitelor; mai profundă la limfocitele T și mai superficială la limfocitele B

este un atribut exclusiv al celulelor imunocompetente. Ea este determinată de prezența pe suprafața acestora a unor compuși chimici care poartă responsabilitatea primirii informației antigenice, a traducerii și amplificării ei, finalizate prin producerea efectorilor imuni. Pentru desemnarea compușilor din membrana celulelor prin care se realizează recunoașterea imunologică, a intrat în uz în ultimul timp termenul generic de „receptori imunologici". După Gheție (1977), ei pot fi grupați în următoarele categorii:

1. receptorii pentru antigen, de natură imunolgobulinică (receptori Ig), au o structură întru totul asemănătoare cu anticorpii, identificîndu-se cu aceștia cel puțin prin partea din moleculă la nivelul căreia se găsesc situsurile combinative. Restul moleculei poate fi diferit în raport cu clasa căreia îi vor aparține imunoglobulinele eliberate în finalul răspunsului imun. Astfel, receptorii imunoglobulinici din membrană sînt de tip IgD și IgM, chiar dacă anticorpii produși vor aparține unei alte clase (de exemplu, IgG).

Receptorii Ig se găsesc pe limfocitele T și B și sînt absenți la macrofage și celulele K. Densitatea lor pe limfocitele B este mai mare decît pe limfocitele T.

Se constată și diferențe în ce privește poziția lor în grosimea membranei celor două tipuri de limfocite a receptorilor. În timp ce poziția lor este mai exterioară și mai proeminentă la limfocitele B, la celulele T sînt situați mai profund (fig. 7).

Distribuția lor pe suprafața celulelor, indiferent de tip, poate fi continuă (difuză) sau discontinuă (discretă); în cazul din urmă, receptorii sînt grupați sub forma unor insule (Vitetta și Uhr, 1972).

Receptorii Ig sînt deplasabili în grosimea membranei, mobilitate care se activează în cursul recepționării informației antigenice;

2. receptorii pentru imunoglobuline sînt grupări chimice care se identifică în ceea ce privește structura chimică cu regiunile Fc ale imunoglobulinelor. La nivelul lor, se fixează pe celule imunoglobuline exogene. Cînd acestea sînt cuplate cu un antigen, receptorii Fc pot constitui sediul fixării pentru complexe antigen-anticorp.

Receptorii Fc se găsesc pe macrofage și pe celulele K. Limfocitele B sînt o parte Fc^+ și o parte Fc^-. Proporția limfocitelor T Fc^+ este redusă inițial și crește proporțional cu dezvoltarea răspunsului imun. Jabbar (1977) identifică receptori Fc și pe suprafața timocitelor, capabili însă de a fixa numai IgG monomer. Același autor constată că receptorii Fc de pe macrofag au o afinitate mai ridicată pentru IgG, decît cei de pe suprafața limfocitelor. În stările de imunitate sau alergie mediată celular, celulele prevăzute cu receptori Fc au un efect citotoxic asupra celulelor îmbrăcate cu imunoglobuline;

3. receptorii pentru complement (receptori C) reprezintă sediul de pe suprafața celulei unde se pot fixa diferitele fracțiuni ale complementului, de regulă C_3. Complementul nu se fixează însă singur pe celule, ci numai cînd se găsește în contextul unui complex antigen-anticorp.

Scanned with OKEN Scanner

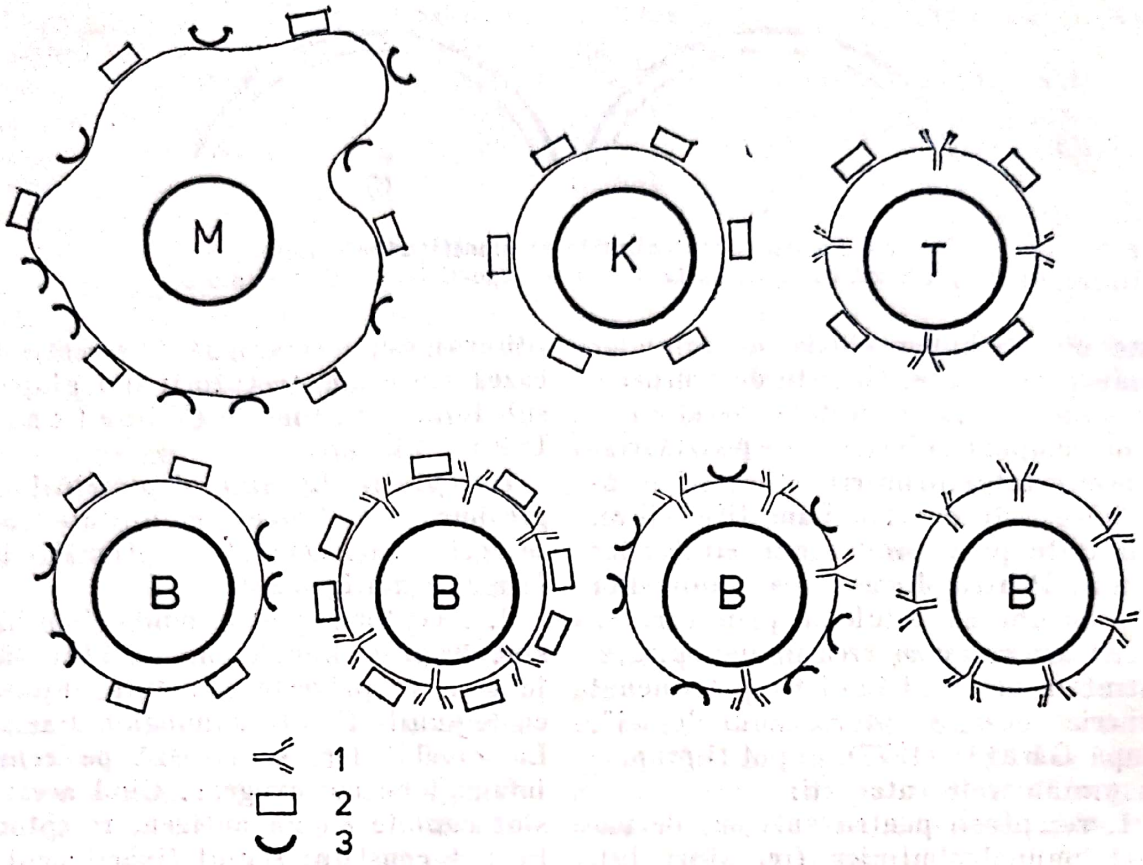


Fig. 8 — Distribuţia receptorilor pe suprafaţa diferitelor celule, care intervin în răspunsul şi reacţiile imune:
M — macrofag; *K* — celulă *K*; *T* — limfocit *T*; *B* — limfocit *B*; *1* — receptor *Ig*; *2* — receptor *Fc*; *3* — receptor *C*

Receptorii C se găsesc pe macrofage şi pe unele subpopulaţii de limfocite B şi sînt absenţi pe limfocitele T şi pe celulele K.

Existenţa acestor trei tipuri principale de receptori (fig. 8) determină recunoaşterea imunologică şi fixarea antigenului pe receptorii Ig, cînd este singur, pe receptorii Ig şi Fc cînd este cuplat cu anticorpii şi pe toate trei tipurile de receptori cînd se găseşte în cadrul unui complex antigen-anticorp-complement.

În afară de categoriile de receptori menţionate, pe suprafaţa celulelor imunocompetente se mai pot găsi receptori pentru lectine mitogene de tipul concanavalinei A şi fitohemaglutininei, capabile de a induce transformarea blastică, receptori pentru globulele roşii de oaie, pentru endotoxinele bacteriilor Gram negative etc. Uneori apariţia unor receptori poate fi indusă de prezenţa agenţilor infecţioşi. Astfel Nakamura şi col. (1978) au constatat formarea de receptori Fc pe suprafaţa celulelor, consecutiv infecţiei acestora cu virus herpes simplex şi citomegalovirus.

Fagocitoza şi prelucrarea intrafagocitară a antigenului. Antigenul, ca orice structură non self, este recunoscut de celulele cu funcţii fagocitare şi înglobat de acestea. În cazul cînd fagocitoza a fost realizată de polimorfonucleare, antigenul este complet degradat, pierzîndu-se astfel informaţia antigenică, iar în consecinţă nu va avea loc nici un fel de răspuns imun.

În cazul înglobării antigenului de către un macrofag, digestia acestuia nu duce la degradarea lui totală, păstrîndu-se nealteraţi determinanţii antigenici. În funcţie de talia molecu-

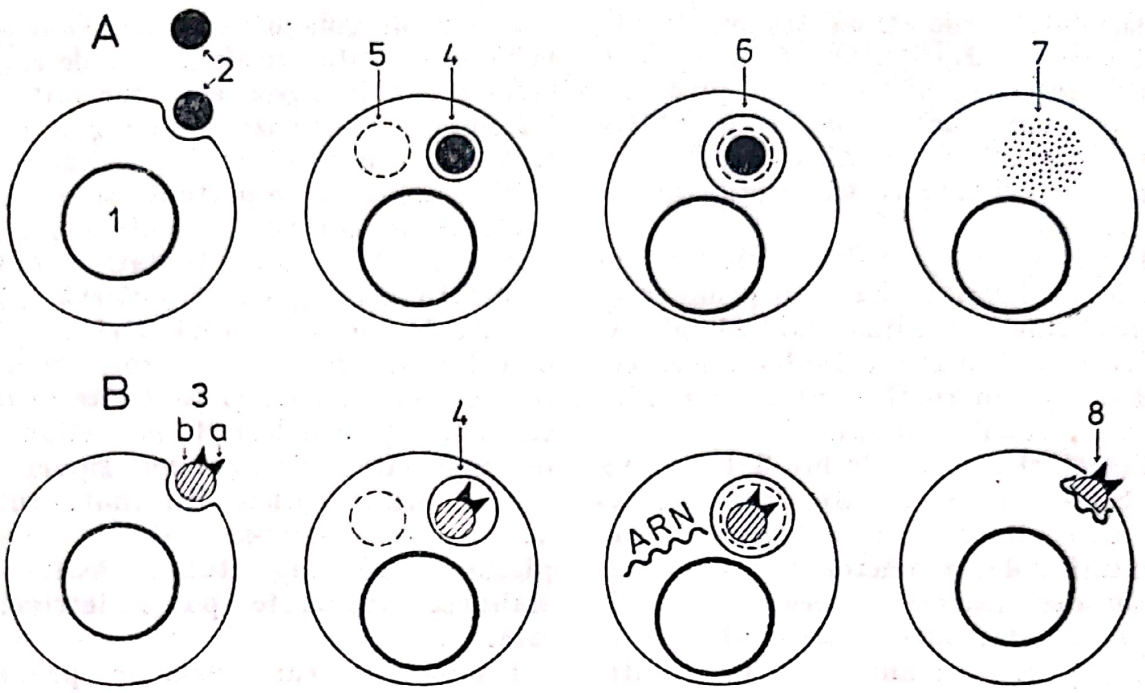


Fig. 9 — Tipuri de fagocitoză

A — fagocitoză normală; B — fagocitoză imună; 1 — macrofag; 2 — material fagocitabil neantigenic; 3 — antigen — a — haptenă b — purtătorul de haptenă (Carrier); 4 — fagosom; 5 — lizosom; 6 — fagolizosom; 7 — digestie completă a materialului fagocitat; 8 — complex antigen-ARN-expus la suprafaţa macrofagului în vederea transmiterii informaţiei antigenice, către limfocit

lară a antigenului, înglobarea lui de către macrofag poate fi un proces de fagocitoză propriu-zis, de pinocitoză (în cazul toxinelor bacteriene) şi, mai rar, de penetraţie sau difuziune liberă prin membrana celulară a fagocitului. Degradarea antigenului are loc la nivelul fagolizozomilor, o parte din antigen fiind descompusă pînă la termenii finali, iar o parte fiind menţinută într-o formă care păstrează nealterate atributele antigenităţii pe o perioadă care este în funcţie de T1/2 (fig. 9).

Astfel, macrofagele peritoneale degradează antigenele în proporţie de 90%. Restul de 10% este reţinut la suprafaţa celulelor şi vehiculat în organism; T1/2 este în jur de cîteva săptămîni.

O serie de experienţe au demonstrat că prelucrarea intrafagocitară a antigenului are un rol esenţial în imunogeneză. Cîteva din cele mai convingătoare în acest sens sînt următoarele:

— inocularea la un animal cu potenţialul imunoformator anihilat prin iradiere, a unui antigen în asociaţie cu limfocite şi macrofage determină apariţia anticorpilor; în timp ce la martor iradiat inoculat numai cu un amestec de antigen plus limfocite, sinteza anticorpilor este absentă;

— inocularea albuminei serice bovine singură determină un răspuns imun mai slab comparativ cu inocularea acesteia în amestec cu macrofage;

Informaţia antigenică nedegradată şi care reprezintă probabil haptena este potenţată prin combinarea ei cu ARN, fapt demonstrat prin mai multe experienţe, ca:

— însămînţarea unui antigen (bacteriofagul T_2) într-o populaţie de macrofage, urmată de executarea unui extract fenolic bogat în ARN şi adăugarea acestuia într-o populaţie de limfocite determină sinteza anticorpilor antifag T_2. Tratarea prealabilă a extractului fenolic cu ribonucleazăi anihilează efectul inductor al anticorpogenezei;

— proprietăţile de superantigen ale

antigenului asociat cu fragmente de ARN extras din culturi de macrofage însămînţate şi incubate în prealabil cu antigen; combinaţia antigen-ARN are o valoare imunogenă sensibil superioară comparativ cu cea a antigenului singur.

După toate probabilităţile, informaţia antigenică sau „antigenul prelucrat" sub forma unui cuplu haptenă-ARN este transmisă limfocitelor, celulele care au rolul esenţial în producerea efectorilor imuni.

Cercetări recente ale lui Thomas şi Shevach (1978) asupra formei în care informaţia antigenică este transmisă de la macrofag limfocitului T au demonstrat că aceasta poate fi o combinaţie între antigenul heterogen prelucrat şi antigenul Ia specific macrofagului. Asocierea celor două antigene pare a se realiza prin intermediul unui compus codificat de gena Ir.

Trecerea prin macrofag pare a nu fi însă o etapă totdeauna obligatorie a răspunsului imun pentru absolut toţi antigenii. S-a demonstrat că unii antigeni pot fi recunoscuţi direct la nivelul receptorilor imunologici ai limfocitelor, fără să fi trecut prin faza intrafagocitară a unui macrofag. Pe baza acestor diferenţe de comportare, antigenele pot fi împărţite în dependente şi independente de macrofage.

Intervenţia macrofagelor în procesul de imunogeneză pare a nu se rezuma însă exclusiv la prelucrarea antigenului. Numeroase date de literatură (Feldman, 1972; Unanue, şi col. 1972 etc.) stabilesc rolul macrofagului de mediator în diferite forme de cooperare intercelulară pe care le implică etapele următoare ale procesului de imunogeneză.

Informarea antigenică a limfocitelor. Limfocitului îi revine un rol esenţial în imunogeneză. El primeşte informaţia antigenică prin receptorii Ig de la suprafaţa lui. Aceasta poate fi preluată prin contactul direct al limfocitului cu antigenul în cazul antigenelor macrofag-independente sau prin contact cu macrofagul în cazul antigenelor prelucrate intrafagocitar de către macrofage. În acest caz transmiterea informaţiei se realizează printr-un contact direct între macrofag şi limfocit. Sediul cel mai important al acestor contacte îl constituie centrii germinativi ai ganglionilor limfatici, unde, în jurul macrofagelor, se observă aglomerări de limfocite mici, strîns lipite de celula macrofagică. La zona de contact dintre fagocite şi limfocite se observă întrepătrunderi ale formaţiunilor de suprafaţă ale ambelor tipuri de celule, printre microvilii limfocitului activat insinuîndu-se valurile hialoplasmice ale fagocitului. Astfel se stabilesc adevărate punţi intercelulare.

Limfocitele care primesc primele informaţia antigenică sînt în marea majoritate a cazurilor limfocitele T, indiferent dacă răspunsul final va fi de tip umoral sau celular. Diferenţa va consta însă în faptul că în cazul imunităţii celulare rămîn implicate numai celulele T, în timp ce în cazul imunităţii umorale limfocitul T reprezintă o treaptă intermediară în filiera răspunsului imun, informaţia antigenică fiind transmisă în final unui limfocit B. Unele antigene sînt însă capabile să acţioneze direct asupra limfocitelor B, celulele T fiind excluse din circuitul informaţiei antigenice. Din punct de vedere al capacităţii antigenelor de a stimula celulele T sau direct celulele B, ele pot fi împărţite în T-dependente şi T-independente.

T-dependenţa sau independenţa este corelată cu numărul de grupări determinante al moleculei sau particulei de antigen; sînt de regulă T-dependente antigenele cu un număr mic de grupări determinante.

T-independente sînt antigenele care conţin grupări determinante repetitive. Ele au de cele mai multe ori o structură polimerică; în acest grup se încadrează unele endotoxine, polizaharidele pneumococice, flagelina etc. Stimularea directă a limfocitelor B

Scanned with OKEN Scanner

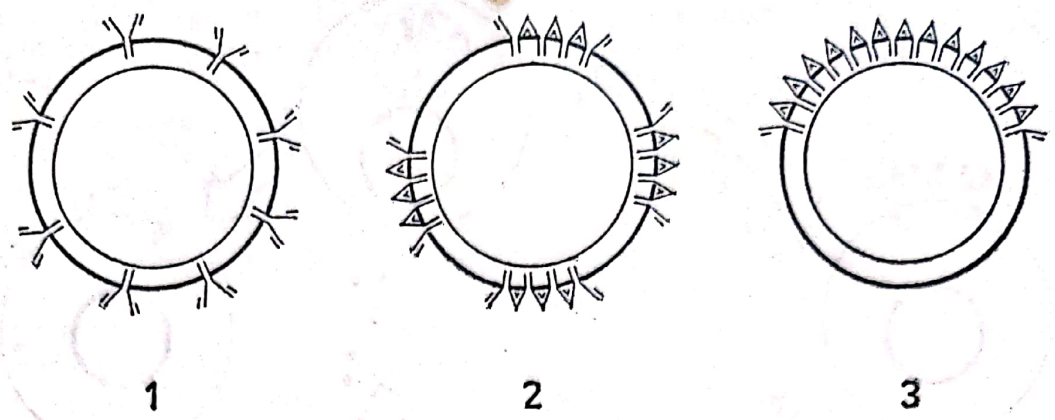


Fig. 10 — Redistribuirea receptorilor Ig în dubla membrană a limfocitelor:
1 — distribuţie continuă; 2 — gruparea receptorilor în petece (patching) şi 3 — în bonetă (capping)

de către antigenele T-independente duce în final la elaborare de anticorpi din clasa IgM şi absenţa sintezei IgG.

Antigenele T-dependente, care determină răspunsuri imune umorale, acţionează prin stimularea limfocitelor T-helper (ajutătoare) care nu produc direct efectori imuni; ele vor transmite mesajul antigenic prin cooperare intercelulară limfocitului B, care după transformarea lui în plasmocit va elabora anticorpii specifici.

Şi în cazul imunităţii celulare este probabilă intervenţia limfocitului T helper acesta avînd rolul de transmiţător al informaţiei antigenice limfocitului T-efector.

În timpul primirii informaţiei antigenice are loc în membrana limfocitului o rearanjare a receptorilor Ig, în sensul grupării lor în petece (patches) sau într-o bonetă (cap) (fig. 10).

Petecele sînt insule de receptori Ig rezultate în urma comasării acestora în mai multe zone de pe suprafaţa celulei.

Boneta rezultă din confluarea polară a petecelor, fenomen numit bonetare (capping).

Deplasarea receptorilor Ig are loc la suprafaţa limfocitului, în spaţiul delimitat de cele două straturi lipidice ale membranei. Deplasarea receptorilor Ig nu este corelată cu mişcarea celorlalţi receptori imunologici.

La nivelul petecelor şi bonetei are loc cuplarea antigenului pe suprafaţa limfocitului. S-a dovedit însă că nu numai antigenele pot determina formarea petecelor şi a bonetei, ci şi alţi liganzi constituiţi din substanţe de tipul fitohemaglutininei sau al concanavalinei A.

Condiţia cea mai importantă pentru concentrarea receptorilor în petece sau bonetă o constituie multivalenţa liganzilor. Antigenele monovalente nu determină formarea de petece sau bonete.

Temperatura influenţează formarea bonetei, fenomenul neavînd loc sub 20°C, dar nu influenţează formarea petecelor. Dependenţa de o anumită temperatură a bonetării indică o relaţie între acest proces şi activitatea metabolică a limfocitului.

Complexele antigen-anticorp care se constituie la nivelul receptorilor Ig pot evolua în continuare în două direcţii: pot fi endocitate fiind incluse în citoplasmă sau se pot exfolia, desprinzîndu-se de celulă (fig. 11).

Endocitoza este un fenomen pe care limfocitele îl manifestă numai faţă de complexele antigen-anticorp, ele fiind altfel lipsite de proprietăţi fagocitare.

Endocitarea poate privi atît boneta, cît şi petecele cu antigenul fixat pe suprafaţa lor. Complexele receptor Ig-antigen sînt degradate în interiorul pinolizozomilor în care aceştia ajung

Scanned with OKEN Scanner

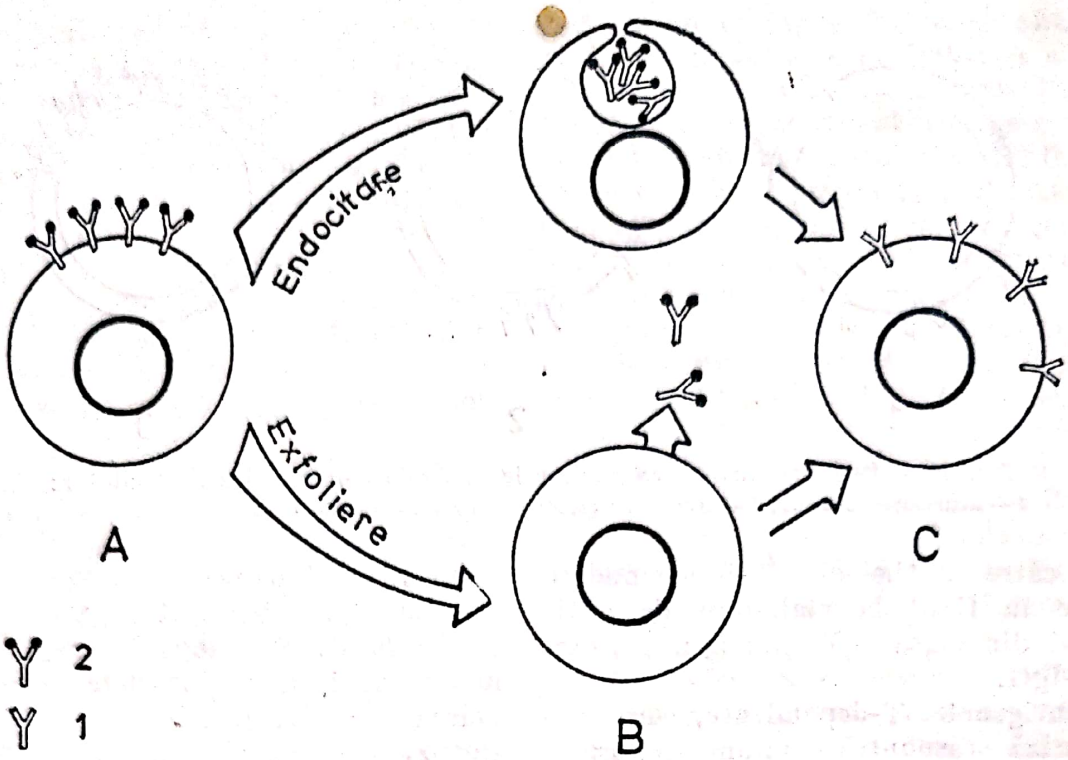


Fig. 11 — Fenomenele posibile după constituirea complexelor „receptor-antigen" pe suprafața limfocitului

A — limfocit cu complexe receptor *Ig* — antigen;
B — endocitarea sau exfolierea antigenului (modularea);
C — regenerarea receptorilor; *1* — receptor; *2* — complex receptor-antigen

prin endocitare. Este mai bine cunoscut modul de degradare a antigenului care este descompus în compuși mai simpli. După N o s s a l și col. (1965), celulele anticorpoformatoare conțin 1—4 molecule de antigen. Subdiviziunile în care este descompus antigenul depind de compoziția chimică a acestuia. După G h e ț i e (1972), filiera catabolică a complexului „receptor Fc-IgG" implică într-o primă fază desfacerea legăturilor disulfidice între lanțurile peptidice (H și L), urmată de fragmentarea acestora în porțiunile Fab și Fc și apoi în fragmente și mai mici (V_H, C_H, V_2, Fc^-). În final, soarta diferitelor porțiuni din IgG este inegală. Astfel, o parte este degradată pînă la nivel de aminoacizi, în timp ce alte porțiuni pot rămîne sub forma unor fragmente mai mari. S-a constatat rămînerea nealterată în limfocit a unor fragmente Fab (G h e ț i e și M o t a ș, 1971), care pot fi eliminate din celulă nedigerate.

Modificările suferite în celulă de receptor sînt mai puțin cunoscute; cu privire la soarta lui după endocitare au fost emise trei ipoteze și anume:

— posibilitatea degradării receptorului într-un mod similar ligandului;

— ipoteza expulzării complexului ligand-receptor după un anumit timp de remanență intracelulară;

— posibilitatea recuperării și a reutilizării receptorului după despărțirea lui de ligand.

Indiferent de procesele intracelulare pe care le suferă complexul receptor antigen după endocitarea lui, limfocitul stimulat antigenic suferă mai multe tipuri de transformări și anume:

— procese de reorganizare intracelulară, care constau în creșterea cantității de acizi nucleici și o intensificare generală a proceselor metabolice, determinată de amplificarea morfologică și funcțională a aparatului ribozomal și ergastoplasmic;

— transformarea blastică a limfo-

citului, care devine limfoblast, a cărui evoluţie ulterioară este în funcţie de originea sa timică sau bursală;

— expansiunea clonală, constînd în proliferarea limfocitelor stimulate, generaţiile rezultate consecutiv proliferării fiind fiecare capabilă să producă efectori imuni specifici antigenului.

Exfolierea complexului receptor-antigen constă în desprinderea acestuia de pe suprafaţa limfocitului. Acest fenomen pare a fi implicat în transmiterea mesajului antigenic de la limfocitele T-helper către limfocitele B. Complexul receptor-antigen exfoliat ajunge pe limfocitele B prin acţiunea mediatoare a macrofagelor (F e l d m a n, 1972).

După endocitarea sau exfolierea complexelor antigen-receptor, celula rămîne temporar fără receptori implicaţi în formarea complexelor; acest fenomen a fost descris prima oară pentru antigenul TL de către B o y s e şi col. (1967) şi a fost numit modulare antigenică.

Receptorii sînt însă regeneraţi de celulă, fenomen numit refacerea sau reapariţia receptorilor. R a f f şi D e P e t r i s (1973) au stabilit pe celule cultivate *in vitro* că timpul de refacere pentru receptorii Ig variază între 8 şi 20 ore.

T a u s s i g şi M u n r o (1975) demonstrează posibilitatea elaborării de către celulele T stimulate antigenic, în anumite condiţii, a unui „factor" de natură glicoproteică avînd masa moleculară de 40 000—50 000 daltoni. Sinteza acestui „factor" este codificată de gene Ir şi el este implicat în formarea unui complex exfoliabil constituit de data aceasta din trei elemente. Complexele „factor-receptor-antigen" exfoliate devin apoi capabile să suplinească limfocitele T stimulate, avînd capacitatea de a se fixa pe limfocitele B, foarte probabil prin intermediul macrofagelor.

Modele de cooperare intercelulară în răspunsul imun. Rezumînd rolul deja menţionat anterior al fiecărei categorii de celule imunocompetente în dinamica răspunsului imun, rezultă următoarele:

a) Macrofagul intervine în următoarele modalităţi:

— în fagocitarea şi prelucrarea antigenului cu păstrarea informaţiei antigenice într-o formă transmisibilă limfocitului;

— în transmiterea informaţiei antigenice către limfocit;

— în medierea cooperării intercelulare între limfocitele T şi B;

b) Limfocitele T-antigen reactive, fiind de mai multe calităţi, pot evolua după stimularea lor antigenică, după cum urmează:

— se transformă în limfocite specific sensibilizate funcţionînd ca efectori imuni în imunitatea mediată celular sau în alergia întîrziată de tip IV, direct sau după prealabila cooperare cu celule T_2-helper.

— devin celule de memorie, responsabile de reacţia anamnestică (răspunsul secundar) în cazul rapelului;

— devin celule helper (T_2) intervin în răspunsul umoral determinat de antigenele T_2dependente prin recepţionarea informaţiei antigenice şi transmiterea ei către limfocitele B;

— devin celule supresoare (T_1) care intervin în stările de imunosupresie.

c) Limfocitele B recepţionează informaţia antigenică direct în cazul antigenelor T-independente sau prin intermediul limfocitelor T-helper stimulate în cazul antigenelor T-dependente.

În îndeplinirea acestor funcţii imunobiologice între celulele imunocompetente intervin diferite modalităţi de cooperare.

1. Cooperarea macrofag-limfocit se realizează prin contact intercelular. Macrofagul transmite limfocitului informaţia antigenică prelucrată intrafagocitar. Prezenţa macrofagelor are în general un efect stimulator pentru afluxul şi proliferarea limfocitelor, care se exercită atît prin antigenele de

Scanned with OKEN Scanner

histocompatibilitate de pe suprafaţa macrofagelor, cît şi prin „monokine" factori solubili care odată eliberaţi în mediu acţionează şi în absenţa macrofagelor.

Acţiunea unor asemenea factori activatori duce la constituirea de aglomerări de limfocite în jurul macrofagelor şi implicit la facilitarea transmiterii mesajului antigenic.

2. Cooperarea între limfocite este un fenomen constant şi indispensabil realizării răspunsului imun umoral determinat de antigenele T-dependente. Informaţia antigenică este obligatoriu preluată de un limfocit T şi apoi transmisă limfocitului B. Cu privire la posibilităţile de realizare a cooperării T—B au fost emise mai multe modele ipotetice şi anume:

a) interacţiunea directă T-B (Mitchinson, Rajewsky), care presupune intervenţia oarecum pasivă a limfocitului T-helper; acesta fixează prin receptorii săi antigenul în segmentul purtător (carrier) al acestuia, haptena rămînînd expusă spre exterior şi fiind oferită limfocitelor B. Antigenele care în porţiunea de purtător posedă mai multe grupări determinante se pot fixa încrucişate pe 2—3 limfocite T-helper, care concurează la prezentarea antigenului către un limfocit B. Acest model este infirmat de unele fapte experimentale: de exemplu, celule T inerte îmbrăcate artificial cu antigen, puse în contact cu celule B, transmit acestora grupările determinante fără ca acest contact să fie urmat de sinteză de anticorpi;

b) interacţiunea triunghiulară directă T-M-B- (Askonas, Unanue, Roelants, Katz) implică intervenţia mediatoare a macrofagului între limfocitele T şi B; cooperarea se poate realiza simultan de acelaşi macrofag, aderînd concomitent un limfocit T şi un limfocit B. Microfagul pe a cărui suprafaţă este situat antigenul fixat nespecific (consecutiv fagocitozei imune) sau specific, prin intermediul unor anticorpi citofili aderenţi de receptorii Fc ai macrofagului, oferă antigenul ambelor tipuri de limfocite cu grupările determinante ale segmentului purtător orientat spre limfocitul T şi cu haptena spre limfocitul B;

c) interacţiunea T-M-B prin factori solubili este admisă pentru complexele receptor Ig-antigen exfoliate de pe suprafaţa celulelor T, care trec pe suprafaţa celulelor B; după desprinderea lor de limfocitul T ele se fixează pe suprafaţa macrofagului, iar acesta le prezintă celulelor B;

d) interacţiunea T-B prin complexul „factor-receptor-antigen" (Taussig şi Munro), constituit aşa cum s-a arătat anterior, se realizează fără intermediul macrofagului. Limfocitele B prezintă un „acceptor", complementar receptorului, a cărui sinteză este codificată de gene Ir, fapt demonstrat prin anihilarea răspunsului imun în cazul tratării prealabile a unei populaţii de limfocite B cu un ser anti I. Poziţia acceptorului este în vecinătatea nemijlocită a receptorului Ig.

Cooperare T-M-B cu intervenţia complementului (Dukor şi Hartmann): limfocitul T stimulat antigenic eliberează factori solubili, în special enzime lizozomale care au un efect activator pentru fracţiunea C_3 a complementului. Aceasta se fixează pe receptorii C ai limfocitelor B, făcîndu-le receptive la primirea semnalului antigenic.

Modelele menţionate, prezentate schematic în fig. 12, nu sînt pe deplin demonstrate experimental, avînd mai mult valoarea unor încercări de a oferi explicaţii logice unor evenimente din filiera răspunsului imun.

În privinţa raporturilor între cooperare a T-B şi histocompatibilitatea celor 2 tipuri de celule, experienţele executate de Piguet şi Vassalli (1978) pe şoareci atimici au relevat următorul aspect particular: celulele T alogenice histoincompatibile cooperează cu celulele B ale acceptorului, transmiţîndu-le informaţia antigenică, dar mor (con-

Scanned with OKEN Scanner

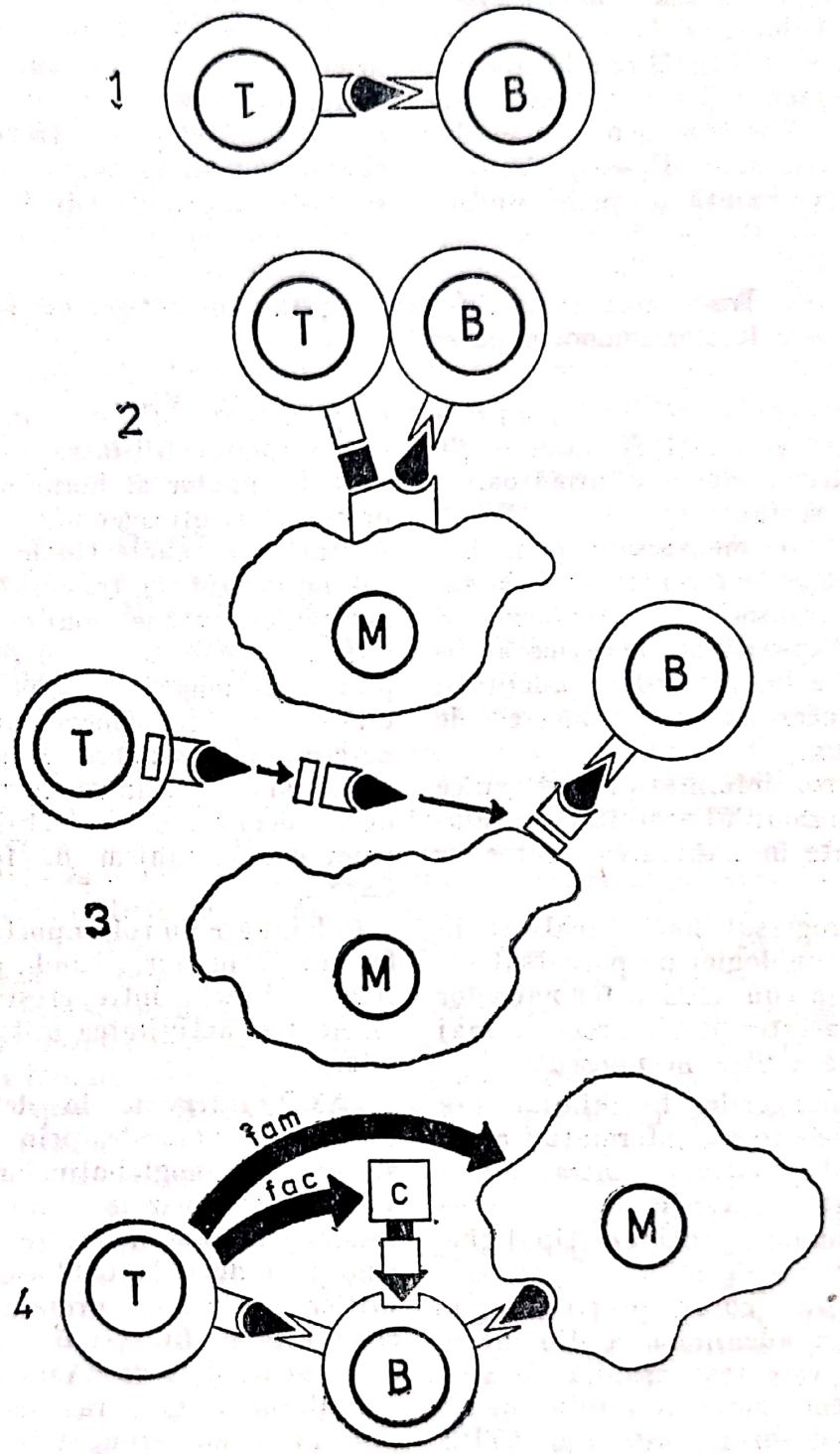


Fig. 12 — Modele ipotetice de cooperare celulară

1 — cooperare *T—B* (Rajewsky, Mitchinson); *2* — cooperare triangulară TMB (Asconas, Unanue, Katz); *3* — cooperare prin transmiterea complexelor „factor-receptor-ligand" (Taussig şi Munro) exfoliate de pe limfocitul *T* pe limfocitul *B* prin intermediul macrofagului; *4* — model de cooperare cu intervenţia unor factori activatori şi a complementului *T* — limfocit *T*; *B* — limfocit *B*; *M* — macrofag; *C* — complement; fam — factori activatori ai macrofagului; fac — factori activatori ai complementului

form terminologiei autorilor „se sinucid") imediat după îndeplinirea misiunii lor de helper.

Gherson (1974), Diaz-Espada şi col. (1978) iau în discuţie pentru răspunsul imun T independent un model de filiaţie a celulelor $B_1 \rightarrow B_2$, în care celulele B_1 reprezintă un prim stadiu, stimularea antigenică determinînd transformarea lor în B_2.

Cooperarea T-T este un fenomen care intervine foarte probabil în transformarea unor populaţii de celule T senzitive în T efectoare (reactive); nu se cunosc detalii asupra modului în care se realizează acest tip de cooperare.

IV. 4.5. Traducerea şi amplificarea informaţiei antigenice la nivelul celulelor imunocompetente

Termenii „traducere" şi „amplificare" au fost adoptaţi de imunologia modernă, acordîndu-li-se următoarele semnificaţii semantice:

Traducerea este mecanismul prin care semnalul antigenic recepţionat pe membrană este transmis în citoplasmă şi preluat de dispozitivele genetice şi fiziologice ale celulei în vederea adaptării activităţii acestora la producerea de efectori imuni;

Amplificarea informaţiei antigenice reprezintă ansamblul activităţilor celulare implicate în elaborarea efectorilor imuni.

Cu tot progresul imens realizat în domeniul imunologiei pe parcursul ultimilor ani în cunoaşterea fenomenelor intime ale acestor două procese, mai persistă încă multe necunoscute.

Studiul mesagerilor biochimici care reglează transmiterea informaţiei antigenice la dispozitivele intracelulare a demonstrat intervenţia în acest proces a unor compuşi peptici de tipul glucagonului cu rol de mesageri primari, care se combină cu receptorii şi activează enzima adenilciclaza din membrană, care este responsabilă de sinteza 3,5-adenozinmonofosfatului ciclic (cAMP) şi a adenozintrifosfatului (ATP); 3,5-adenozinmonofosfatul ciclic este un nucleotid ciclic, la fel ca 3,5-guanozinmonofosfatul (cGMP). Ambele substanţe au rolul de mesageri secundari în traducerea intracelulară a semnalelor antigenice, avînd o funcţie reglatoare în activitatea biochimică a celulei prin controlul unor procese şi infecţii ca: permeabilitatea celulară, acţiunea enzimelor şi hormonilor, sinteza proteinelor, glicogenoliza, lipoliza etc. Alături de nucleotidele ciclice, un rol important în trasferul informaţiei antigenice revine ionilor de calciu. Calciul se găseşte într-o relaţie de cuplaj funcţional de sens contrar cu cAMP. Creşterea concentraţiei de Ca^{2+} determină o scădere a cantităţii de cAMP şi invers. Între Ca^{++} şi cAMP există deci o stare de echilibru reglată printr-un mecanism de feed-back al Ca^{++}.

Calciul are un rol important în proliferarea celulelor, fiind demonstrată relaţia directă între creşterea acestui element şi activitatea mitotică a celulelor.

cAMP intervine în determinismul imunităţii umorale prin declanşarea sintezei imunoglobulinelor. El activează histokinazele, care catalizează fosforilarea histonelor, reacţie care la rîndul ei duce la deblocarea ADN şi iniţierea sintezei proteinelor. Acest efect este în funcţie de doză. Numai cantităţile mici de cAMP au un efect stimulator asupra răspunsului imun; cele mari au, dimpotrivă, un efect inhibitor, diminuînd sensibil numărul celulelor anticorpoformatoare. Acţiunea negativă a concentraţiilor mari de cGMP-cAMP are un rol important şi în imunitatea celulară, intervenind în citotoxicitatea mediată celular. În timpul lizei celulei ţintă se constată o

Scanned with OKEN Scanner

sensibilă diminuare a cantității de cAMP.

— cGMP pare a constitui un factor de seamă în asigurarea cooperării intercelulare. Spre deosebire de cAMP, care este antagonic cu calciul, cGMP crește și acționează probabil sinergic cu acest element. În timpul contactelor T-B se constată o creștere a cGMP intracelular, ca o consecință probabilă a activării guanilciclazei din membrană.

După Doina Onică (1977), interacțiunea cAMP-cGMP în traducerea semnalului antigenic la nivelul limfocitelor se desfășoară în următoarea dinamică:

Stimulul antigenic determină activarea adenilciclazei, ca prim mesager, declanșînd sinteza cAMP care intervine ca mesager secundar la cel mult 12—20 ore de la acțiunea antigenului asupra receptorului. Creșterea cAMP stimulează inițierea sintezei anticorpilor. În absența unui contact celular, cAMP crește ajungînd la o concentrație mare, defavorabilă producției de anticorpi și determină instalarea unei stări de toleranță. În cazul stabilirii unui contact T-B se activează însă guanilciclaza, care catalizează sinteza de cGMP. Acumulîndu-se, acesta anihilează efectul inhibitor al dozelor mari de cAMP asupra sintezei imunoglobulinelor, stabilindu-se un raport cGMP/cAMP favorabil anticorpogenezei.

Biosinteza imunoglobulinelor reprezintă principalul proces prin care se finalizează efectul amplificator al stimulului antigenic în răspunsul imun umoral.

Imunoglobulinele sînt sintetizate de plasmocitele derivate din limfocite B stimulate antigenic. Sinteza imunoglobulinelor se desfășoară după modelul general de sinteză a proteinelor, valabil pentru orice tip de celulă.

Studiul ribozomilor la nivelul cărora are loc biosinteza lanțurilor peptidice L și H, efectuate pe plasmocite de șoarece, a demonstrat existența unei corelații între masa moleculară a lanțurilor peptidice și mărimea poliribozomilor la nivelul cărora are loc sinteza lor. Astfel, lanțurile L se constituie pe poliribozomi formați din 7—8 ribozomi pe care rulează un ARN_m cu viteza de sedimentare la ultracentrifugare de 13 S (poliribozomi ușori), în timp ce lanțurile H sînt asamblate pe poliribozomi formați din 14—16 ribozomi atașați de un ARN_m de 17 S (poliribozomi grei). Experiențele executate cu aminoacizi marcați cu izotopi radioactivi au permis stabilirea vitezei cu care se realizează sinteza lanțurilor, aceasta fiind de aproximativ 30 secunde pentru un lanț ușor și 75 secunde pentru un lanț greu. Experiențele de tip Dintzis, bazate pe principiul introducerii aminoacizilor marcați pe parcursul sintezei lanțurilor și cele efectuate cu acizi ribonucleici mesageri izolați au demonstrat că sinteza regiunilor constante și variabile ale lanțurilor sînt codificate de o singură moleculă de ARN_m.

Asamblarea lanțurilor H și L are loc în reticulul endoplasmic, de unde trec apoi în aparatul Golgi, de a cărui membrană internă se atașează prin regiunea Fc. La acest nivel este adiționat componentul glucidic sub acțiunea enzimelor glicozil-transferaze.

Polimerizarea imunoglobulinelor polimere (IgM, IgA, dimer) are loc în timpul eliberării anticorpilor din plasmocit, precedată de acumularea lor masivă în sacii ergastoplasmici care se dilată foarte mult luînd aspectul unor „cisterne". În urma unei sinteze masive de imunoglobuline, acestea pot cristaliza, prezentîndu-se la examenul microscopic în frotiurile colorate prin metoda Giemsa sub forma unor corpusculi colorați în roz violaceu (corpii lui Russell).

Eliberarea imunoglobulinelor din plasmocit este posibilă pe 2 căi: prin secreția lor treptată sau prin clasmatoză.

Secreția imunoglobulinelor are loc prin aparatul lui Golgi, unde moleculele de imunoglobulină îmbracă forma unor mici vezicule, preluate de pe su-

Scanned with OKEN Scanner

prafaţa sacilor ergastoplasmici limitrofi. Pe faţa concavă a aparatului Golgi, imunoglobulinele se organizează în granule de secreţie sub forma unor mici formaţiuni sferice învelite de o membrană fină. Granulele de imunoglobuline, eliberate din aparatul Golgi, migrează prin citoplasmă spre membrana celulară, pe care o traversează ieşind în mediul extracelular. Eliberarea imunoglobulinelor prin secreţie este un proces comparabil cu un fenomen de pinocitoză inversă.

Clasmatoza este o formă de eliberare masivă a imunoglobulinelor prin desprinderea din celulă a unor fragmente compacte de citoplasmă. Acestea se detaşează din celulă printr-un fenomen de înmugurire. De regulă, fragmentele de citoplasmă detaşate prin clasmatoză conţin saci ergastoplasmici plini cu imunoglobuline. În cazul producţiei masive de anticorpi, clasmatoza se poate transforma într-un proces de liză totală a plasmocitului.

Efectorii imuni celulari sînt reprezentaţi de celule imunocompetente — limfocite sau macrofage — care în urma stimulării antigenice s-au transformat ele însele în celule de o calitate nouă, dobîndind proprietatea de a se cupla sau de a reacţiona specific cu antigenele care au determinat geneza lor. Rolul lor este preponderent în imunitatea de tip celular şi în alergia întîrziată de tip IV, avînd importante implicaţii în reacţia de rejet a alogrefelor şi în fenomenele de autoagresiune.

Celule care pot fi considerate ca efectori imuni celulari sînt limfocitele reactive, macrofagele activate şi macrofagele armate.

L i m f o c i t e l e r e a c t i v e sau specific sensibilizate rezultă din limfocitele T antigen reactive transformate blastic în urma stimulării antigenice, direct sau consecutiv cooperării cu o celulă T-helper.

Principalele lor însuşiri prin care-şi exercită rolul de efector imun este capacitatea elaborării unor factori umorali de tipul limfokinelor sau efectul citotoxic faţă de celule ţintă cu antigene specifice pe suprafaţa lor. Nu există suficientă certitudine dacă celulele T citotoxice sînt absolut identice cu cele responsabile de alergia întîrziată sau dacă este vorba de tipuri diferite. Limfocitele T citotoxice fac parte din categoria limfocitelor mici. Ele diferă de limfocitele T helper şi prezintă unele înrudiri antigenice cu limfocitele T imunosupresoare (antigenul comun Lg -2,3). Limfocitele T specific sensibilizate din alergia întîrziată sînt în schimb mai apropiate de celulele T helper.

M a c r o f a g e l e a c t i v a t e sînt fagocite capabile să distrugă prin digestie intracelulară, materiale fagocitate, care de obicei nu sînt sensibile la digestia intrafagocitară. Această însuşire, macrofagul o dobîndeşte prin recepţionarea unor semnale chimice primite de la celulele T. Macrofagele activate pot fi considerate ca factori de imunitate, avînd unele însuşiri caracteristice imunităţii naturale şi altele ale imunităţii dobîndite. Mecanismul în sine este nespecific, dar el este controlat printr-un proces specific la nivelul limfocitelor T (fig. 13).

M a c r o f a g e l e a r m a t e sînt fagocite care acţionează selectiv şi specific asupra unui anumit antigen. Semnalul chimic al celulelor T care produce armarea macrofagelor este factorul de armare sau SMAF (specific macrophage arming factor) şi distinct de factorul de activare. Factorul de armare este omologabil cu receptorul pentru antigen, care se transferă de pe suprafaţa celulei T pe suprafaţa macrofagului. Fenomenul se încadrează în mecanismele de înaltă specificitate ale imunităţii celulare.

Celulele K, deja amintite la celulele imunocompetente, nu pot fi încadrate printre efectorii imuni specifici. În primul rînd ele nu dobîndesc nici o însuşire nouă datorită unei stimulări antigenice, iar efectul lor citocid este rezultatul interacţiunii cu o porţiune

Scanned with OKEN Scanner

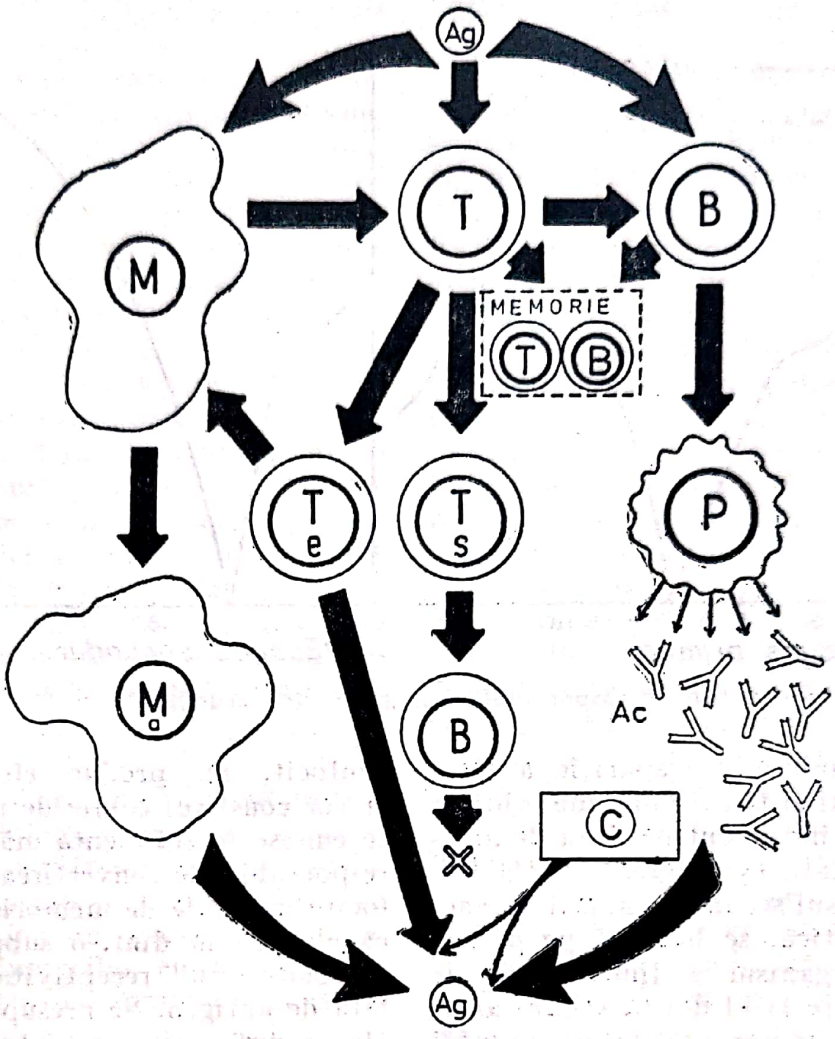


Fig. 13 — Participarea celulelor şi efectorilor în răspunsul şi reacţiile imune

Ag — antigen; *M* — macrofag; *T* — limfocit *T*, *B* — limfocit *B*; *Te* — limfocit *T* — efector; *Ts* — limfocit *T* — supresor; *P* — plasmocit; *Ma* — macrofag activat; *Ac* — anticorpi; *C* — complement

a moleculei de anticorp fără nici o legătură cu specificitatea acestora (regiunea Fc). Intervenţia lor este în schimb condiţionată şi precedată de o reacţie imună specifică şi anume îmbrăcarea celulei ţintă cu anticorpi.

IV. 5. Răspunsul imun primar şi secundar

Răspunsul primar reprezintă producerea de efectori imunologici, consecutivă unui prim contact al organismului cu antigenul. Desfăşurarea reacţiilor din organism, prin care se realizează răspunsul primar, corespunde descrierii procesului de imunogeneză prezentat anterior.

Răspunsul secundar se referă la producerea efectorilor imuni în urma repetării stimulului antigenic, după un timp care poate varia de la 8—14 zile, pînă la perioade foarte îndelungate, care în cazul unor antigene pot dura toată viaţa. Diferenţele între răspunsul primar şi cel secundar constau în

Scanned with OKEN Scanner

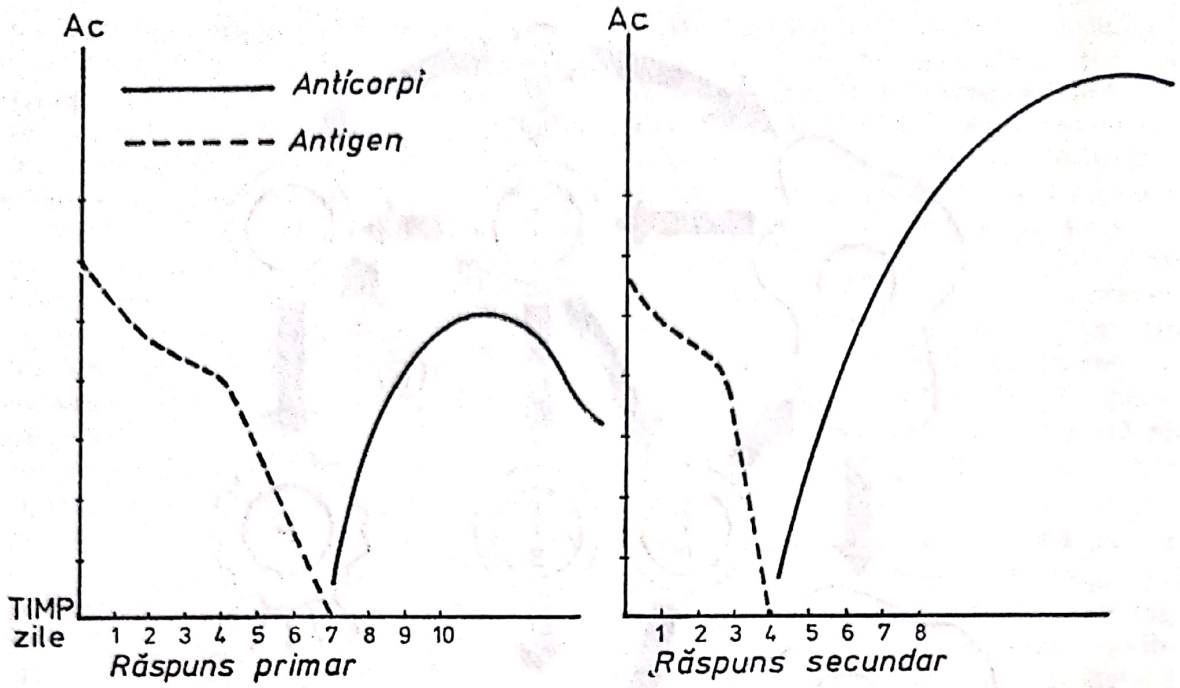


Fig. 14 — Dinamica răspunsului imun primar și secundar

scurtarea timpului de apariție a efectorilor imuni și titrul mult mai ridicat al acestora, indiferent de doza de antigen reinoculată (vezi graficul din fig. 14). Răspunsul secundar, numit și reacție anamnestică, se bazează pe persistența în organism a limfocitelor de memorie, care la al doilea stimul antigenic poartă responsabilitatea gradului mult mai mare de promptitudine și intensitate a răspunsului imun.

Răspunsul secundar diferă de cel primar și prin clasele de imunoglobuline, care predomină. În timp ce în cadrul răspunsului primar apar întîi IgM urmate de IgG, în răspunsul secundar se constată o netă predominare de la început a IgG; există deci posibilitatea comutării sintezei de IgM în IgG, posibilitate determinată probabil tot de limfocitele de memorie.

Limfocitele de memorie rezultă printr-un proces de citodiferențiere imunologică a limfocitelor de obicei T, dar uneori și B antigen sensitive în timpul stimulării lor antigenice. O parte din limfocitele stimulate, după transformarea lor în plasmocite, devin efectoare, iar altele rămîn în stadiul de limfocit, nu produc efectori imuni și vor constitui celule de memorie. Nu se cunosc în suficientă măsură factorii responsabili de convertirea acestor limfocite în celule de memorie. Se admite că ele provin dintr-o subpopulație de limfocite cu receptivitate maximă față de antigen. Se presupune chiar că ele ar putea avea receptori Ig de tip IgG în loc de IgD și IgM. Spre deosebire de limfocitele efectoare, care după transformarea lor în plasmocit nu trăiesc mai mult de cîteva zile, celulele de memorie sînt de viață lungă. În cadrul răspunsului secundar există posibilitatea convertirii celulelor de memorie în celule efectoare.

În determinismul imunității locale la nivelul mucoaselor (fenomenul „Homing"), Salmon și Le Jan (1979), arată că după stimularea antigenică locală, principalele evenimente, caracteristice fenomenului de imunogeneză, se petrec la nivelul ganglionilor aferenți și al țesuturilor limfoide limitrofe mucoaselor; de la acest nivel se extind în canalul toracic și apoi în torentul sanguin prin care efectorii imuni produși sînt recirculați la nivelul mucoaselor.

IV. 6. Particularităţi ale răspunsului imun în cancer

Celula malignă reprezintă un „non self" faţă de care organismul ar trebui să reacţioneze printr-un răspuns imun, iar prin acţiunea efectorilor rezultaţi, ţesutul neoplazic ar trebui rejectat sau oprit în proliferarea sa anarhică.

În realitate organismul dezvoltă un răspuns imun faţă de antigenele tumorale iar reacţiile imune în care predomină mecanismele celulare de tip citotoxic acţionează anticanceros. Altfel frecvenţa bolii canceroase ar fi mult mai mare.

Dar în unele cazuri reacţiile imune nu reuşesc nici să inhibe, nici să distrugă celulele maligne, fapt care se datoreşte unei game destul de largi de mecanisme prin care procesele canceroase reuşesc să se sustragă supravegherii imunologice.

Acestea sînt:

1. lipsa sau gradul redus de antigenitate al celulelor tumorale; această însuşire este mai frecventă la tumorile cu o perioadă lungă de latenţă. În natură pare a avea loc un proces de selecţie naturală a tumorilor cu antigenitate redusă, selecţie care contribuie la explicarea menţinerii şi extinderii bolii canceroase;

2. furişarea procesului malign în condiţiile integrităţii sistemului de supraveghere imunologică (sneaking through), fenomen descris de O l d şi col. (1962), care constă în supravieţuirea unui număr foarte redus de celule histoincompatibile nesesizate de mecanismele imunităţii; în momentul cînd aceste celule au declanşat procesul malign, organismul nu mai este capabil să-l învingă datorită uneia din celelalte căi de sustragere deja menţionate;

3. apariţia de celule maligne imunorezistente, insensibile la acţiunea efectorilor imuni, care este un fenomen realizabil prin selecţia de sublinii celulare maligne rezistente;

4. modificarea imunologică este un fenomen studiat pe sisteme tumorale, care constă în schimbarea antigenităţii celulelor histoincompatibile, în sensul diminuării histocompatibilităţii. El poate fi considerat ca un mecanism de adaptare care asigură supravieţuirea într-un sistem celular alogenic al unor celule histocompatibile. Cu toate că în cazul cancerului acest fenomen are, de regulă, consecinţe nefavorabile pentru organism datorită diminuării histoincompatibilităţii celulelor maligne, el deschide perspective în practica medicală pentru asigurarea tolerării alogrefelor;

5. mecanismul de inducere a tolerării ţesuturilor maligne prin participarea anticorpilor antitumorali:

a) facilitarea imunologică (enhancement) este un fenomen datorat cuplării pe celula tumorală a unei categorii de anticorpi care nu numai că nu inhibă, ci dimpotrivă, facilitează dezvoltarea tumorii. Anticorpii facilitanţi sînt IgG, care se fixează pe suprafaţa celulei maligne îmbrăcînd-o fără a avea un efect citotoxic, decît numai în cazul cînd sînt în cantitate foarte mare. Acoperirea celulei tumorale cu anticorpi facilitanţi are următoarele consecinţe:

— împiedică exercitarea în continuare a stimulării antigenice de către celulă, antigenii de pe suprafaţa acesteia nemaivenind în contact direct cu sistemul anticorpoformator;

— protejează celula de fixarea altor efectori imuni, care ar putea avea un eventual efect citocid asupra ei.

Totodată, sinteza anticorpilor facilitanţi împiedică printr-un mecanism de feed-back producerea altor anticorpi;

b) dezantigenizarea celulelor tumorale, prin alţi anticorpi descrisă de G r e e n în 1954, este un fenomen asemănător cu facilitarea, dar este produs de alte categorii de anticorpi, care insuficienţi pentru a omorî celula tumorală îi maschează antigenele, inhibînd

Scanned with OKEN Scanner

continuarea dezvoltării răspunsului imun;

6. blocarea răspunsului sau a reacţiilor imune prin factori toxici, de obicei diferiţi metaboliţi tumorali care se exercită asupra celulelor producătoare de efectori imuni este un alt mecanism posibil care poate înlesni procesul de oncogeneză;

7. capacitatea proliferativă deosebită (gradul de malignitate ridicat) care se traduce printr-o intensă activitate mitotică şi un potenţial de multiplicare ieşit din comun al celulelor maligne caracteristic mai ales pentru diferite tipuri de carcinoame; în astfel de cazuri, indiferent de antigenitatea ţesutului tumoral, intensitatea procesului canceros depăşeşte capacitatea sistemului defensiv imunologic;

8. stările imunodepresive de deficit imun favorizează în mod logic oncogeneza. Unele observaţii au stabilit rolul unor astfel de stări în creşterea receptivităţii imunologice paralele cu înaintarea în vîrstă explică şi incidenţa mai ridicată a tumorilor maligne la organismele adulte şi bătrîne. Formele avansate de cancer, mai ales cele în care s-a produs deja metastazarea în diverse organe, sînt însoţite aproape totdeauna de imunodepresie.

Scanned with OKEN Scanner

V Efectori umorali ai imunității (anticorpii)

Anticorpii sînt substanțe chimice complexe sintetizate de către sistemul celular al imunității printr-un proces indus de prezența în organism a unui antigen străin; ei sînt reprezentați prin imunoglobuline care se combină (reacționează) specific cu antigenele corespondente sau cu antigenele înrudite. Formarea anticorpilor și capacitatea acestora de a reacționa cu antigenele, *in vivo* sau *in vitro*, constituie componente esențiale ale răspunsului care se află la baza fenomenului de apărare imună, fiind în același timp implicate în realizarea metodelor de diagnostic al bolilor caracterizate prin sinteză de imunoglobuline specifice.

Luate în considerație într-un sens mai larg, imunoglobulinele includ o familie de proteine înrudite din punct de vedere chimic, filogenetic, funcțional și antigenic. Ele sînt prezente la animalele vertebrate; existența lor la nevertebrate nu a fost pînă în prezent clar demonstrată.

V. 1. Compoziția și structura imunoglobulinelor

V. 1.1. Compoziția chimică

Imunoglobulinele (Ig) sînt proteine eterogene, formate din lanțuri polipeptidice; principalele componente, întîlnite la toate clasele de imunoglobuline sînt (fig. 15, 16, 17):

— *lanțurile ușoare* (notate cu L, de la cuvîntul englez light=ușor), prezente în două variante — lambda (λ) și kappa (κ); în cadrul fiecărei molecule de Ig există un singur tip de lanț ușor. Lanțurile L au greutatea moleculară de 22 000—24 000. Structura lor primară este reprezentată de secvențialitatea aminoacizilor, în număr de 214 la lanțul kappa și 213—216 la lanțul lambda. În regiunea variabilă (notată V_λ, respectiv V_κ) a fost stabilită existența a numeroase modificări ale poziției (secvenței) aminoacizilor, în special în cazul lanțurilor kappa.

Lanțurile ușoare nu au markeri specifici în funcție de clasa de imunoglobuline căreia îi aparțin. În schimb, lanțurile kappa și lambda se disting cu ușurință între ele prin metode imunologice;

— *lanțurile grele* (notate cu H, de la cuvîntul englez heavy=greu); în

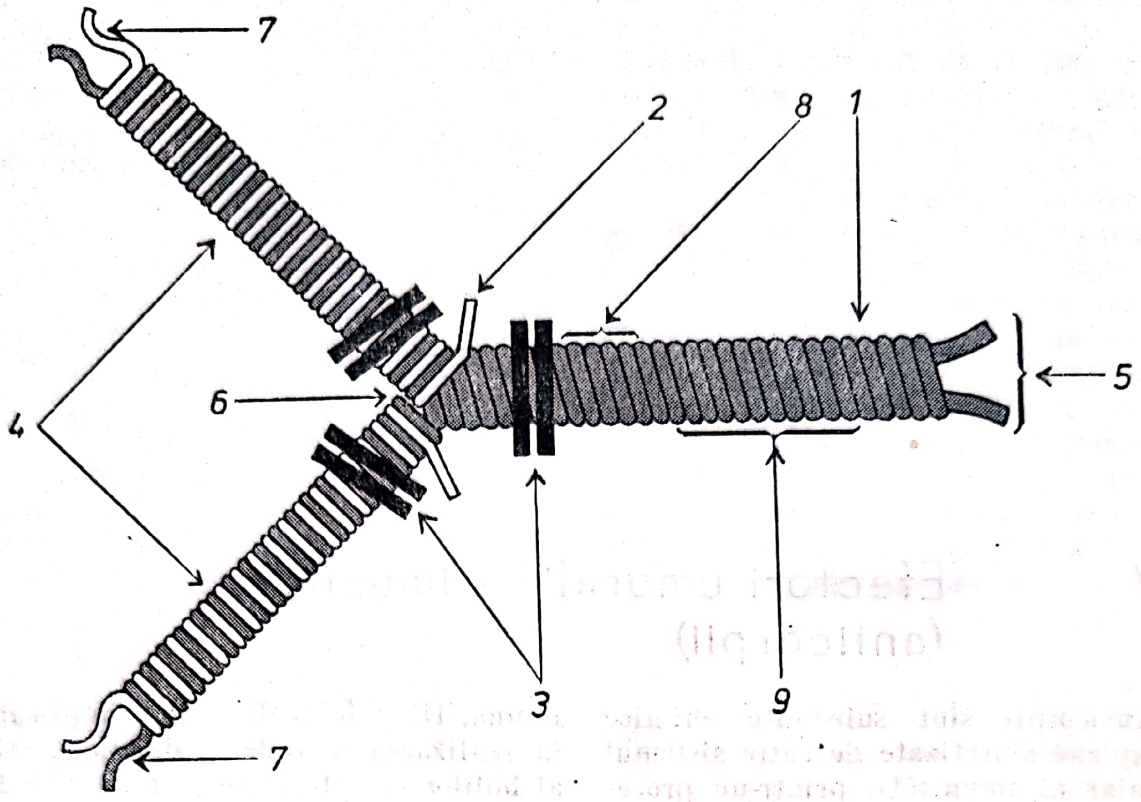


Fig. 15 — Molecula de IgG.

1 — lanț greu; *2* — lanț ușor; *3* — punți disulfidice; *4* — fragmente Fab; *5* — fragment *Fc*; *6* — regiune „balama" *7* — situs de combinare; *8* — zona de combinare cu complementul; *9* — zona grupărilor determinante (după B u x t o n și F r a s e r)

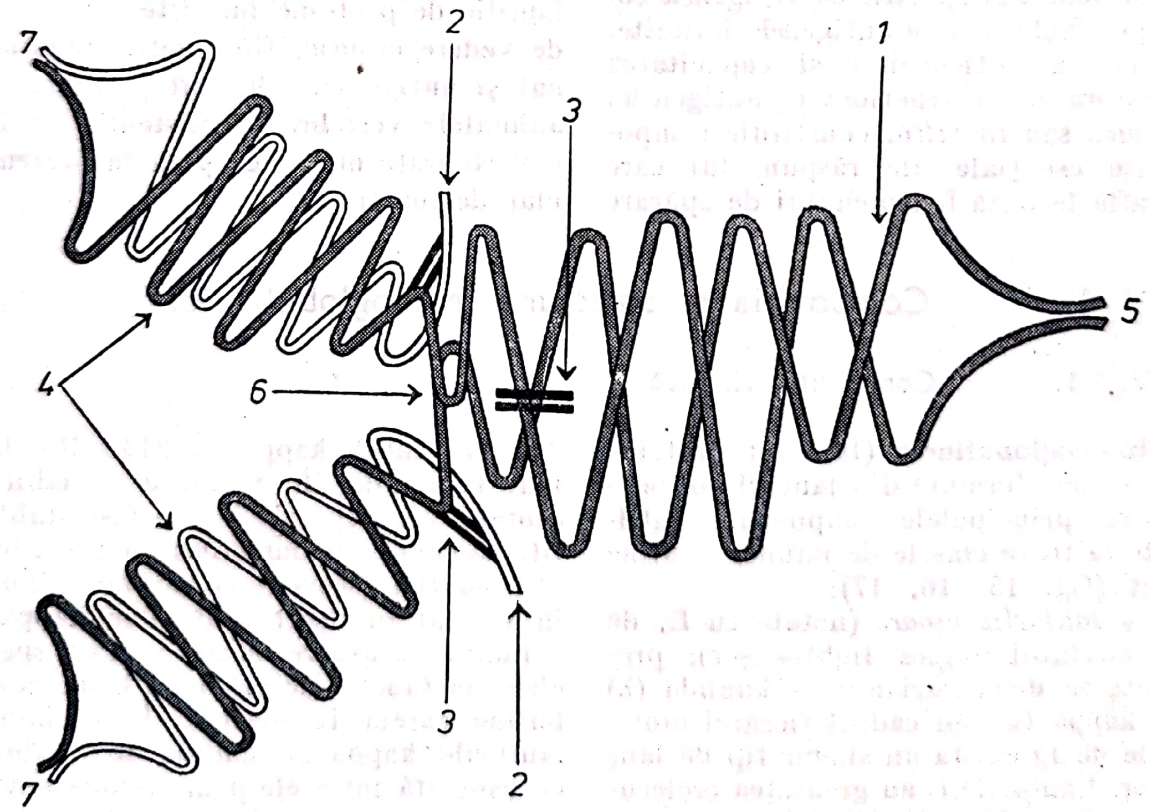


Fig. 16 — Molecula de IgG.

1 — lanț greu; *2* — lanț ușor; *3* — punți disulfidice; *4* — fragmente Fab; *5* — fragment *Fc*; *6* — regiunea „balama"; *7* — situs de combinare; (după B u x t o n și F r a s e r)

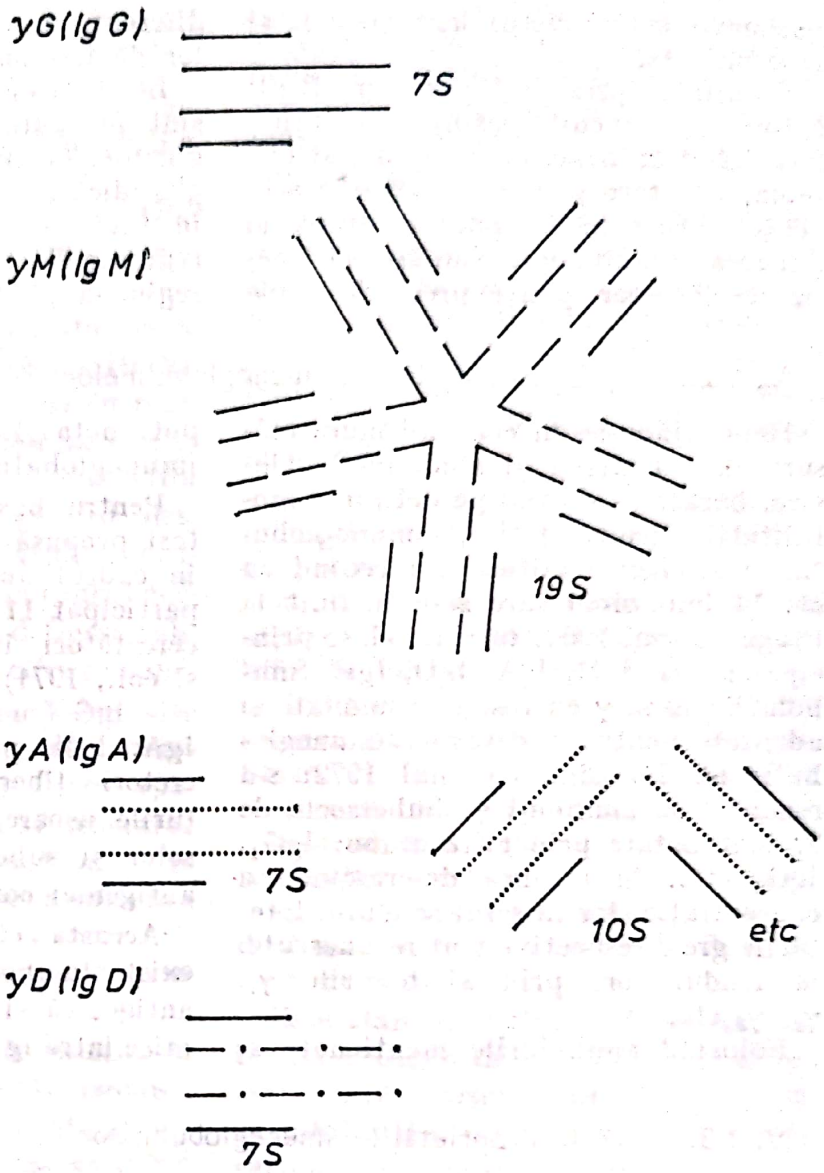


Fig. 17 — Reprezentarea schematică a moleculelor diverselor clase de imunoglobuline umane, construite pe baza modelului Porter

funcţie de clasa de imunoglobuline în care sînt prezente, lanţurile H sînt denumite: gamma (γ) la IgG, miu (μ) la IgM, alfa (α) la IgA, delta (δ) la IgD şi epsilon (ε) la IgE. Greutatea molecular a lanţurilor grele este variabilă în jurul valorilor 45 000—63 000. Structura chimică şi antigenitatea acestor lanţuri sînt definitorii pentru clasele de imunoglobuline. În cadrul unora dintre clasele de imunoglobuline, au fost descrise mai multe tipuri de lanţuri grele, fapt care a impus şi recunoaşterea mai multor subclase de Ig: 4 în cazul IgG, cîte 2 în cazul IgM şi IgA la om. Secvenţa aminoacizilor este variată în cadrul regiunii V şi relativ constantă la regiunea C.

Lanţurile H şi L formează, împreună, moleculele de imunoglobuline. Structura „clasică", cea descrisă pentru imunoglobulina G umană, include două lanţuri grele şi două lanţuri uşoare, legate între ele prin punţi disulfidice. După Edelman şi col. (1970) legăturile disulfidice din IgG umană sînt prezente: între lanţurile H şi L, între lanţurile H, în unele cazuri între lanţurile L, între lanţurile H ale unor componente din cadrul moleculelor —

polimeri, în interiorul lanţurilor L şi respectiv H.

Stabilirea prezenţei punţilor disulfidice a devenit posibilă în urma localizării aminoacizilor cistină şi cisteină, ca atare prin determinarea secvenţelor care includ punţile dintre şi din cadrul lanţurilor. Numărul şi localizarea acestor punţi prezintă unele diferenţe în cadrul claselor şi subclaselor de imunoglobuline.

În moleculele de imunoglobuline sînt prezente, în proporţii variabile, glucide, în special hexoze. Componenţa glucidică a fost evidenţiată în special în fragmentul cristalizabil, în cadrul regiunii C a lanţului H, precum şi în regiunea „balama".

V. 1.2. Nomenclatura imunoglobulinelor

Renunţîndu-se în cea mai mare măsură la definiţiile şi simbolurile clasice, bazate în special pe definirea mobilităţii electroforetice, imunoglobulinele au fost clasificate, începînd cu cei 14 imunologi care s-au întîlnit la Praga în anul 1964, în cinci clase principale: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE. Simbolurile Ig şi γ au fost recomandate şi adaptate pentru a desemna imunoglobulinele. Începînd cu anul 1972, s-a renunţat la simbolul γ. Subclasele de Ig sînt notate prin cifre arabe: IgG_1, IgG_2 etc.. în ordinea descrescîndă a concentraţiei lor în serul sanguin. Lanţurile grele respective sînt recunoscute, la rîndul lor, prin simbolurile γ_1, γ_2, γ_3 etc.

Folosind simbolurile menţionate se pot nota formulele moleculelor de imunoglobuline: $\gamma_2\kappa_2$, $(\mu_2\lambda_2)_5$ etc.

Pentru bovine, ovine şi caprine a fost propusă o nomenclatură similară, în cadrul unui simpozion la care au participat 11 dintre cei mai cunoscuţi cercetători în domeniu (A a l u n d şi col., 1971). Au fost recunoscute clasele IgG (cu subclasele IgG_1 şi IgG_2), IgA, IgM, precum şi componenta secretorie liberă. S-a confirmat că lanţurile uşoare, aparţinînd tuturor claselor şi subclaselor, au determinanţi antigenici comuni.

Această clasificare se bazează pe existenţa unor similitudini de structură antigenică şi de proprietăţi fizico-chimice între Ig acestor specii şi Ig umane.

V. 1.3. Proprietăţile imunoglobulinelor

Rezultînd din însumarea greutăţilor moleculare ale celor două tipuri de lanţuri, greutatea moleculară a imunoglobulinelor este de 140 000—150 000 pentru IgG, 150 000—160 000 pentru IgA, 800 000—950 000 pentru IgM, 175 000—180 000 pentru IgD şi 185 000—190 000 pentru IgE.

Constanta de sedimentare a acestor proteine variază între 6,17 S (la IgG) şi 19,0 S (la IgM). Ca urmare a faptului că moleculele de IgA pot exista sub mai multe forme, constantele lor de sedimentare variază între 6,18—11,4 S.

Conţinutul de hidraţi de carbon se situează între 2,5% la IgG şi 10—12% la IgD şi IgE.

Concentraţiile claselor de imunoglobuline în serul sanguin sînt variabile. Astfel, valorile stabilite pentru om sînt (în mg/ml): 0,0003 (IgE), 0,03 (IgD), 1 (IgM), 2 (IgA), 12 (IgG).

V. 1.4. Regiuni şi fragmente de imunoglobuline

Lanţurile polipeptidice existente în moleculele de Ig conţin două regiuni distincte denumite *V* (variabilă) şi *C* (constantă). Regiunea C se situează în partea carboxil-terminală a lanţurilor şi are aceeaşi structură primară la toate

Scanned with OKEN Scanner

lanţurile din aceeaşi clasă, subclasă şi tip de imunoglobulină. Regiunea V, formată din aproximativ 110 aminoacizi, este prezentă în partea amino-terminală a lanţurilor şi se caracterizează prin existenţa structurilor primare, diferite chiar în cadrul aceleiaşi clase şi subclase.

Regiunea constantă a lanţului H la IgG_1 include trei zone dispuse linear, probabil omoloage între ele şi cu regiunile similare ale lanţurilor uşoare şi ale lanţurilor grele aparţinînd altor clase de imunoglobuline. Au fost descrise variante ale secvenţialităţii aminoacizilor din regiunea V în cadrul aceleiaşi clase de Ig; acestea definesc subgrupele de Ig, notate prin cifre romane, ca de exemplu $V\lambda_I$, $V\lambda_{II}$, $V\lambda_{III}$ etc.

Prin tratarea moleculelor de imunoglobuline cu enzime proteolitice (papaină, tripsină, pepsină) şi separarea lanţurilor polipeptidice constitutive în urma desfacerii legăturilor disulfidice a devenit posibilă studierea structurii acestor molecule şi evidenţierea existenţei unor fragmente.

Digestia enzimatică sau chimică a moleculei de IgG a permis izolarea fragmentelor *Fab* (de la engl. „fragment antigen binding"=fragment avînd proprietatea de a lega antigenul) şi *Fc* (fragment care fixează complementul sau fragment cristalizabil).

Fab constă din regiunile variabile ale lanţurilor grele şi uşoare vecine. Rezultă că acest fragment include porţiunile amino-terminale.

Gheţie şi Mihăescu (1973), Waldman şi Gheţie (1971) au decelat existenţa fragmentelor Fab şi Fc ca urmare a scindării imunoglobulinelor de către catepsine. Acelaşi fenomen se realizează „spontan" şi în soluţiile de imunoglobuline datorită prezenţei în acestea a plasminei şi a catepsinelor. În funcţie de modul de obţinere a fragmentului Fab (prin tratare cu papaină, pepsină sau Br CN) au fost constatate o serie de diferenţe în privinţa dimensiunilor şi a păstrării unei punţi disulfidice.

Cu toate că fragmentul Fab este deosebit de stabil, s-a reuşit scindarea sa în părţi care cuprind regiunea variabilă a lanţului H, respectiv regiunea variabilă a lanţului L. Porţiunea de lanţ H izolată din fragmentul Fab a fost denumită, de unii autori, fragment *Fd*.

Fab reprezintă o parte importantă a moleculei de Ig, în primul rînd datorită prezenţei *situsurilor de combinare*, zone de dimensiuni reduse situate la capătul N-terminal al regiunii variabile. Se admite că celelalte părţi ale moleculei de Ig au în special rolul de a asigura stabilitatea situsurilor de combinare şi, în acest fel, de a contribui la realizarea reacţiilor antigen-anticorp. Situsurile includ porţiuni atît din lanţul H cît şi din lanţul L. Totuşi, capacitatea de legare a antigenului este evident mai intensă la lanţul H (Painter şi col., 1972).

Este stabilit faptul că heterogenitatea moleculelor de anticorpi este în cea mai mare măsură rezultatul marii variabilităţi a regiunii V, deci a situsurilor de combinare; se admite că variabilitatea afectează peste 70% din cele 110 reziduuri de aminoacizi din componenţa regiunii V.

Dimensiunea situsurilor de combinare a fost indirect stabilită prin inhibarea activităţii lor cu ajutorul unor polimeri de lungimi variabile. S-a constatat astfel că pentazaharidele pot bloca, prin „umplere", activitatea situsurilor. De asemenea, avînd în vedere că un compus tetrapeptidic poate fi inclus în situsul de combinare, s-a ajuns la concluzia că o porţiune de lanţ constituit din 10—20 aminoacizi poate să cuprindă în întregime o cavitate de această dimensiune. Aceste constatări

Scanned with OKEN Scanner

au fost confirmate prin cercetări cu ajutorul schimburilor tritiu-hidrogen în cadrul moleculelor de anticorpi.

Fab este deci o componentă monovalentă, capabilă să fixeze antigenul corespondent; această legare nu este însă exteriorizată prin capacitatea de a realiza, de exemplu, precipitarea complexului antigen-anticorp. În acest scop este necesară acţiunea moleculei complete de Ig. Capacitatea de fixare a fiecărui situs de combinare este definită prin termenul *afinitate*; capacitatea anticorpilor de a lega antigenul, în sens mai larg, este cunoscută sub termenul de *aviditate*. Astfel, fiecare din cele 10 situsuri de combinare ale moleculei de IgM au aceeaşi afinitate ca şi fiecare din cele două situsuri ale moleculei de IgG; în schimb, molecula de IgM are o mai mare aviditate decît cea de IgG datorită existenţei unui număr mai mare de situsuri de combinare.

Fragmentul cristalizabil este constituit din regiunile constante ale celor două lanţuri grele, respectiv porţiunea C-terminală a acestora. Fără a avea capacitatea de a lega antigenul, Fc participă, în cadrul moleculei intacte, la realizarea reacţiilor antigen-anticorp. Fc include, datorită prezenţei unor părţi din lanţul H, determinanţi antigenici specifici; el poartă de asemenea grupările chimice care asigură transportul IgG prin placenta unor specii de mamifere.

Zona „balama" este situată, în molecula cu structură „clasică", în porţiunea de trecere între Fab şi Fc, incluzînd o parte redusă, formată dintr-un număr mic de aminoacizi, a lanţurilor grele şi două punţi disulfidice. În această zonă, acţionează papaina, determinînd desfacerea moleculei de imunoglobulină în fragmentele Fab şi Fc. Principalul rol al acestei zone rezidă în contribuţia sa la stabilirea conformaţiei spaţiale a moleculei de Ig.

V. 1.5. Structura lanţurilor imunoglobulinice

Structura primară, respectiv secvenţa aminoacizilor în cadrul lanţurilor polipeptidice, a fost studiată în condiţii deosebit de favorabile la om prin analiza proteinelor patologice de tip Bence-Jones; acestea sînt constituite în exclusivitate din lanţuri uşoare, pot fi obţinute cu uşurinţă în stare pură şi sînt constituite dintr-un număr relativ redus de aminoacizi (ceva mai mult de 200). Aceste cercetări au permis definirea structurii primare complete a unor proteine, descrierea regiunilor V şi C, realizarea modelelor experimentale pentru aplicare la studierea unor componente imunoglobulinice mai complexe. În acest scop, au fost folosite nu numai proteine patologice ci şi anticorpi purificaţi sau imunoglobuline serice purificate.

Regiunea constantă este prezentă la toate lanţurile polipeptidice care formează moleculele de imunoglobuline. Au fost descrise secvenţe constante în cadrul lanţurilor uşoare (una la $\varkappa$ şi două la lanţul λ) şi grele (4 la lanţurile γ, două la lanţurile μ şi α, cîte una la lanţurile δ şi ε). Au fost realizate, pînă în prezent, determinări complete ale unor lanţuri uşoare şi grele (acestea din urmă îndeosebi în cazul IgG şi IgM). Asemănările dintre secvenţele primare ale regiunilor constante sînt evidente. Fiecare regiune de acest fel include şi o legătură disulfidică intralanţ, fapt care a condus la ipoteza lui E d e l m a n (1970) după care fiecare zonă constituie un *„domeniu"* de-sinestătător. Legăturile dintre lanţuri sînt situate în regiunile dintre domeniile de acest fel. Regiunea care conţine cele mai multe punţi disulfidice între lanţurile grele, situată între aminoacizii 221 şi 233 în cazul lanţului γ, este variabilă într-o foarte mare măsură, fiind diferită în funcţie de subclasa de Ig şi specie. Rezultă că şi în cazul regiunii C există o serie de diferenţe între sec-

venţele lanţurilor polipeptidice. Aşa este exemplul subclaselor de lanţuri umane, în special pentru poziţiile situate în jurul cisteinei.

Regiunea variabilă se caracterizează prin existenţa unor diferenţe evidente; în fapt, nu există lanţuri polipeptidice sintetizate de diverşi indivizi care să prezinte omologii semnificative în regiunea variabilă. Au fost semnalate unele excepţii, suficient de rare pentru a nu modifica acest principiu. Pe de altă parte, lanţurile studiate au permis alcătuirea unor subgrupe în cadrul cărora există unele similitudini ale structurii primare în regiunea variabilă, în privinţa situării unor aminoacizi în anumite poziţii şi prin lungimea apropiată a lanţurilor. Astfel, diferenţele de secvenţialitate în cadrul regiunii variabile a lanţului kappa au condus la nominalizarea a trei subgrupe — V_{KI}, V_{KII}, V_{KIII}. Au fost descrise, de asemenea, 5 subgrupe $V\lambda$ şi 4 subgrupe de V_H. Diferenţele de structură în cadrul regiunii V cunosc grade diferite de variabilitate; sînt descrise zone în care astfel de modificări sînt minore dar şi zone cu structuri foarte diverse; porţiunile respective au fost denumite *hipervariabile*. Existenţa unor astfel de zone în jurul reziduului cisteină, din cadrul porţiunii ce cuprinde legătura disulfidică din regiunea V, permite să se admită că ele contribuie la formarea situsului de combinare.

Cele mai multe dintre variantele structurale includ poziţionări diferite ale unor aminoacizi, ca urmare a diferenţelor de codificare genetică în procesul de sinteză a lanţurilor respective. Sînt evidente, în mod deosebit „înlocuiri" reciproce de reziduuri cu proprietăţi similare. Fără a se reuşi pînă în prezent să se stabilească legi sau scheme care conduc formarea secvenţelor de aminoacizi, se presupune că variaţiile de structură primară apar în urma unor mutaţii individuale întîmplătoare şi în continuare, prin selecţie naturală. În acest proces complicat, sînt, în general, realizate modificări utile, ca urmare a unor informaţii antigenice, fiind eliminate acele variaţii care nu contribuie la ridicarea valorii biologice a proteinei respective. Ca urmare, variabilitatea cea mai redusă se constată în zonele care asigură stabilitatea şi structura spaţială a imunoglobulinei.

În afara imunoglobulinelor umane, secvenţa aminoacizilor în lanţurile polipeptidice a fost mai puţin studiată la alte specii cu excepţia unor animale de laborator. Cercetările efectuate în cazul Ig de şoarece au permis stabilirea secvenţelor complete ale regiunii C a lanţurilor kappa şi lambda, în majoritatea cazurilor fiind vorba de proteine mielomatoase. Au fost descrise, de asemenea, secvenţe parţiale ale imunoglobulinei G ale lanţurilor $\varkappa$ şi ale unei IgA cu o conformaţie particulară (un singur lanţ greu şi un singur lanţ uşor). S-a constatat că mai mult de 90% din imunoglobulinele de şoarece conţin lanţul uşor de tip kappa. Studiul regiunii $V\varkappa$ a condus la evidenţierea unor diferenţe de lungime a lanţurilor şi de compoziţie, substituirile de aminoacizi fiind situate mai ales în zonele hipervariabile. Cercetări numeroase au fost efectuate la iepure, realizîndu-se în special studii cu privire la compoziţia chimică a proteinelor normale şi a proteinelor omogene induse în condiţii experimentale.

Un element particular, care a permis cercetarea IgG, este constituit de absenţa subclaselor acestei proteine, la iepure. În urma inoculării iepurilor cu vaccinuri bacteriene s-a obţinut sinteza imunoglobulinelor — anticorpi cu heterogenitate limitată, foarte apropiată de aceea a globulinelor mielomatoase. Aceste proteine au fost în mare măsură folosite la studiile cu privire la secvenţa aminoacizilor.

Scanned with OKEN Scanner

V. 1.6. Structuri spaţiale

Dacă noţiunea de structură primară se referă la secvenţa şi natura aminoacizilor în lanţurile polipeptidice, este necesar să se reţină, ca un element deosebit de important în înţelegerea biologiei imunoglobulinelor, că acestea sînt organizate în cursul procesului de sinteză, în cadrul unor structuri mai complexe. Acestea se referă la aspectul helicoidal rezultat în urma plierii spiralate a lanţului pelipeptidic (structura secundară), configuraţia tridimensională a lanţului (structura terţiară), asocierea complexă a unor lanţuri (structura cuaternară), în sfîrşit cuplarea unor molecule între ele şi formarea de „giganţi" proteici (glucidoproteici).

Cercetări, considerate în prezent clasice, au demonstrat că molecula de IgG umană are formă cilindrică, cu o lungime de 240 Å şi o secţiune eliptică de 19×57 Å. Aceste date au permis construirea unui model spaţial al IgG care satisface cerinţele compoziţiei cu participarea a patru lanţuri care formează cele două situsuri de combinare situate la extremităţile moleculei (modelul *Edelman şi Gally* —1964). Acest model a fost negat ulterior, cel puţin parţial, datorită faptului că nu ţinea seama de caracterul flexibil în spaţiu al moleculei de imunoglobulină. Ca urmare, N o e l k e n şi col.(1965) au propus un alt model, în care cele două fragmente Fab şi fragmentul Fc sînt legate între ele prin regiunea „balama" — cea care asigură şi flexibilitatea moleculei.

Gradul de flexibilitate a moleculei nu este pe deplin stabilit, datele obţinute prin calcularea „timpului de relaxare rotatorie" fiind extrem de diferite de la un autor la altul. Cu toate acestea, valorile comunicate atestă că mobilitatea moleculelor de imunoglobuline este superioară altor proteine.

Alte modele conformaţionale au fost ulterior avansate, în special în urma unor cercetări efectuate prin aplicarea metodelor fizice ca dispersia în spectru de raze X, microscopie electronică, cristalografie în raze X, spectroscopie în infraroşu, depolarizarea fluorescenţei şi altele. P i l z şi col. (1970) consideră că principalele fragmente componente ale IgG sînt de formă elipsoidală; ei consideră că imunoglobulina G în soluţie are forma literei T, cu lungimea de 200 Å. Ulterior, a fost emisă ipoteza conformaţiei de forma literei y, prin studiul birefringenţei moleculelor aflate într-un cîmp electric.

În procesul de fixare a antigenului de către situsurile de combinare au loc modificări ale conformaţiei spaţiale a moleculei de imunoglobulină: mărirea distanţei dintre cele două braţe constituite de fragmentele Fab sau dimpotrivă, închiderea unghiului format de acestea.

În urma cercetărilor electron-microscopice efectuate de V a l e n t i n e şi G r e e n (citat de G h e ţ i e, 1975) s-a stabilit că molecula de IgG constă din trei subunităţi globulare unite într-o zonă caracterizată printr-un grad ridicat de flexibilitate. În prezenţa antigenului se formează complexe constituite din 3 sau 4 molecule.

S a r m a şi col. (1971) au construit un model al moleculei de IgG constînd din două fragmente globulare Fab, situate perpendicular pe un ax de simetrie (Fc).

Fenomenul de „pliere" a fost descris în cazul lanţurilor polipeptidice, atît pentru porţiunea amino-terminală cît şi pentru cea carboxil-terminală.

Cercetări efectuate prin aplicarea a numeroase metode fizice au demonstrat că în cadrul moleculelor de Ig nu este prezentă conformaţia α-helicoidală a lanţurilor polipeptidice. În schimb, se consideră că acestea realizează coloane paralele de polipeptide, unite între ele prin legături de hidrogen, conformaţie de tip beta.

Scanned with OKEN Scanner

V. 2. Dezvoltarea filogenetică a imunoglobulinelor

Ca şi în cazul altor sisteme şi organe, sistemul imunocompetent a cunoscut o dezvoltare ascendentă pe diverse trepte ale dezvoltării filogenetice pînă la stadiul realizat de către animalele superior organizate.

Astfel, insectele, ca şi alte nevertebrate, par să fie înzestrate cu un sistem imunitar primitiv, capabil să răspundă faţă de unii factori „străini".

La unele animale nevertebrate, au fost puse în evidenţă celule capabile să îndepărteze bacterii şi să distrugă ţesuturi grefate. La viermii anelizi , a fost descris fenomenul de eliminare a allogrefelor şi xenogrefelor. La artropode şi moluşte este semnalată reacţia de fagocitoză.

La unele animale nevertebrate, au fost evidenţiate proteine care prezintă similitudini cu aglutininele de la vertebrate; în urma cercetărilor efectuate, au fost stabilite caracterele fizice şi chimice ale acestora, constatîndu-se că, la unele specii ele îndeplinesc şi funcţia de opsonină.

Toate speciile de vertebrate au capacitatea de a răspunde faţă de antigenele străine prin biosinteză de anticorpi circulanţi şi de a dezvolta reacţii mediate celular. După M a r c h a l o n i s (1974) funcţii similare celulelor de tip T sînt decelate în stadii filogenetice inferioare faţă de cele la care se constată capacitatea de producere a anticorpilor.

Numeroase date experimentale atestă existenţa fenomenelor imunitare pe diverse trepte ale dezvoltării filogenetice. Astfel, prezenţa imunoglobulinelor specifice, în urma inoculării de antigene (fagi, bacterii, eritrocite etc.) a fost constatată la ciclostomi, elasmobranchiate, osteichite, amfibieni şi reptile, bineînţeles la păsări şi mamifere. Moleculele de imunoglobuline de la vertebratele inferioare au fost caracterizate, constatîndu-se numeroase asemănări structurale şi funcţionale cu cele de la primate.

Fenomenele imune au fost studiate într-o mai mare măsură la peşti, avînd în vedere importanţa lor economică, inclusiv în condiţiile creşterii „dirijate".

Capacitatea fagocitară a fost evidenţiată la crap, constatîndu-se că aceasta este mai accentuată faţă de stafilococi în cazul animalelor vaccinate (A v t a l i o n şi S h a h r a b a n i, 1975). Prezenţa fagocitelor în splină, rinichi, spaţiile intermusculare etc. a permis descrierea fenomenului de înglobare a cărbunelui coloidal la unele specii de peşti (E l l i s şi col. 1976).

Prin imersiunea unor peşti în mediul care conţinea albumină serică bovină, A m e n d şi F e n d e r (1976) au creat un model experimental util pentru studiul capacităţii de imunizare a acestor animale. Pe de altă parte, C o l l i n s şi col. (1976) au constatat că în urma inoculării unui vaccin bacterian se induce sinteza anticorpilor; aceasta este inhibată numai la peştii menţinuţi la temperaturi scăzute şi fluctuante în timp ce alte condiţii nefavorabile nu au modificat producţia de imunoglobuline specifice.

Principalele caracteristici ale răspunsului imun comun vertebratelor sînt: prezenţa limfocitelor circulante, plasmocitele fiind evidenţiate la unii rechini şi la speciile filogenetice superioare acestora; formarea anticorpilor şi eliminarea grefelor; dezvoltarea progresivă a sistemului limfoid (începînd cu aglomerări celulare discrete, corespunzînd timusului şi splinei, la specii superioare ciclostomilor); capacitatea anticorpilor de a lega antigenul şi a complexului realizat de a fixa complementul.

Cercetările cu privire la secvenţialitatea aminoacizilor la vertebratele inferioare au demonstrat prezenţa secvenţelor blocate şi neblocate, atît la lanţurile uşoare cît şi la cele grele. La o parte dintre aceste animale, există aspecte similare ale structurilor primare

Scanned with OKEN Scanner

între lanţurile H şi L ca şi între acestea şi secvenţele regiunilor variabile ale lanţurilor grele şi uşoare de la mamifere. Imunoglobulinele vertebratelor inferioare sînt în general heterogene, făcînd parte în special din principalele două clase de imunoglobuline — 7 S şi 19 S.

Cu rare excepţii, imunoglobulinele vertebratelor inferioare includ două lanţuri H şi două lanţuri L, legăturile dintre ele fiind asigurate prin punţi disulfidice. Răspunsul prin anticorpi al acestor animale prezintă similitudini importante cu cel înregistrat la mamifere. În acest sens, pot fi citate aspectele referitoare la secvenţialitate înregistrate în sinteza claselor de imunoglobuline. Există, desigur şi o serie de diferenţe între vertebratele inferioare şi mamifere, în primul rînd producerea tardivă a anticorpilor cu greutate moleculară relativ mică şi modificarea mai lentă a afinităţii anticorpilor.

În legătură cu evoluţia moleculei imunoglobulinice, a fost emisă ipoteza conform căreia aceasta este formată din multiplii unui lanţ primitiv, fapt susţinut în primul rînd de similitudinile de secvenţă existente între diverse lanţuri H şi între lanţurile H şi L. Prin menţinerea unei singure regiuni V şi multiplicarea regiunii C rezultă formulele V_1C_1, V_1C_2, V_1C_3, V_1C_4 (Z i m m e r m a n şi col., 1971). Studiul comparativ al imunoglobulinelor la diferite specii confirmă, în parte, posibilitatea ca moleculele de Ig să fie formate dintr-un lanţ „iniţial" cu greutate moleculară aproximată de 11 000. Astfel, moleculele 5, 7 S (raţă) şi 6 S (broască ţestoasă) se încadrează în formula V_1C_2; lanţurile grele γ, α şi δ de la mamifere corespund formulei V_1C_3; multiplul V_1C_4 poate fi asimilat cu lanţurile μ şi ε de la mamifere, lanţul 7,8 S de la raţă, lanţul greu 7 S de la găină şi lanţurile grele ale imunoglobulinelor cu greutate moleculară mare ale vertebratelor inferioare. Studiul modului de realizare a legăturilor dintre componentele imunoglobulinice arată că acestea au fost iniţial necovalente; ulterior în evoluţia legăturilor disulfidice au scăzut importanţa şi participarea legăturilor necovalente, astfel încît în moleculele respective astfel de legături sînt prezente dar au o forţă de legare evident mai puţin intensă.

În stadiul iniţial al cercetărilor cu privire la imunoglobulinele animalelor vertebrate inferioare se ajunsese la concluzia că acestea sintetizează ca Ig majoră, o proteină cu structură pentamerică, similară imunoglobulinei M de la mamifere. Alte date contrazic acest punct de vedere stabilind, după cum s-a arătat, că imunoglobulina majoritară poate fi la diferite clase de vertebrate, o macroglobulină cu structură tetramerică, cu coeficient de sedimentare 18—22 S sau proteine 7 S şi 13 S.

Datele experimentale de pînă în prezent arată pe de o parte, existenţa unor asemănări evidente între răspunsurile prin sinteză de Ig pe diverse trepte ale dezvoltării filogenetice, începînd cu vertebratele inferioare; pe de altă parte, este demonstrată perfecţionarea şi complicarea acestui răspuns pe măsura trecerii la animale superior organizate. Înainte de a se stabili concluziile definitive în acest domeniu sînt necesare încă cercetări, în special în scopul stabilirii structurii primare a Ig pe toate treptele de dezvoltare filogenetică şi pentru cumularea de date convingătoare cu privire la eventualele înrudiri antigenice între Ig izolate de la reprezentanţi ai tuturor claselor de animale vertebrate.

V. 3. Izotipie, alotipie şi idiotipie

Marea varietate de compoziţie şi structură pe care o prezintă imunoglobulinele este determinată genetic: diferenţele de specificitate existente între populaţiile de molecule de imunoglobuline se încadrează în trei categorii

Scanned with OKEN Scanner

principale, prin implicarea a trei mecanisme genetice care, împreună, contribuie la diferențele dintre lanțurile de imunoglobuline la aceeași specie de animale.

În acest ansamblu sînt incluse: specificitatea izotipică — proprietate generală a antigenelor proteice; specificitatea alotipică, decelată la un număr limitat, dar mereu mărit de antigene proteice; specificitatea idiotipică, limitată la imunoglobuline. Rezultă că o moleculă de Ig poate fi caracterizată prin toate cele trei specificități.

Izotipia implică existența și acțiunea genelor structurale care codifică sinteza polipeptidelor și asamblarea acestora în molecule complexe și polimeri. Rezultanta este reprezentată de formarea imunoglobulinelor care aparțin claselor, subclaselor și tipurilor distincte, descrise anterior, cu proprietăți biologice și structurale diferențiate net față de celelalte clase, subcalse și tipuri. Astfel, de exemplu, în cadrul speciei umane, toți indivizii sintetizează două tipuri de lanțuri scurte și mai multe clase și subclase de lanțuri grele. Aceste polipeptide reprezintă specificități izotipice care sînt similare la toți indivizii de aceeași specie de animal.

Alotipia semnifică biosinteza unor variante ale lanțurilor de imunoglobuline de către grupe de indivizi aparținînd aceleiași specii, proprietate care se transmite ereditar pe baza legilor lui Mendel. Inițial, alotipia a fost considerată ca definind proprietatea unor proteine (inclusiv imunoglobuline) de a exista în mai multe forme (în cadrul unor familii de molecule cu aceeași specificitate izotipică) care nu pot fi diferențiate prin metode fizice sau chimice dar care se identifică prin teste serologice. Ulterior, au fost stabilite și unele elemente de natură chimică, utile în diferențierea alotipurilor, dar folosirea reagenților serologici a continuat să fie hotărîtoare în acest scop.

V. 4. Clasele de imunoglobuline

În funcție de principalele proprietăți fizico-chimice și biologice, imunoglobulinele fac parte din mai multe clase. Definirea lor și, pe această bază, cunoașterea locului pe care îl ocupă în realizarea răspunsului imun specific și a reacțiilor antigen-anticorp pot fi considerate ca avînd un rol major în înțelegerea fenomenelor imunobiologice; în același timp, se poate afirma că aceste familii de molecule eterogene care sînt imunoglobulinele reprezintă inelul de legătură între procesele imunologice fundamentale și concretizarea acestora prin protecție imună, imunodiagnostic, boli autoimune.

Imunoglobulina G (IgG) este principala clasă de imunoglobuline — atît la mamifere cît și la păsări — în primul rînd datorită concentrației sale ridicate în serul sanguin (800—1680, în medie 1 200 mg/100 ml la om, 700—2 200 mg/100 ml la taurine, 500—2 200 mg/100 ml la porc). Majoritatea anticorpilor specifici sînt reprezentați de IgG, ei fiind predominanți în special în stadiile mediane și tardive ale răspunsului imun și în cadrul răspunsurilor anticorpale anamnestice. În același timp, IgG este cea mai studiată dintre toate proteinele implicate în răspunsul imun.

Sinteza IgG se află sub controlul unor gene structurale reprezentate pentru regiunile C și V ale celor două tipuri de lanțuri, prin seturi independente.

Molecula de IgG este formată din două lanțuri grele și două lanțuri ușoare, legate între ele prin punți disulfidice și avînd greutăți moleculare de aproximativ 50 000, respectiv 20 000 daltoni. În cadrul structurii primare a celor două tipuri de lanțuri sînt prezente regiunile variabile și constante, specificitatea moleculelor fiind dată de

Scanned with OKEN Scanner

secvența reziduurilor de aminoacizi din regiunea V, respectiv din porțiunea de moleculă care conține situsurile de combinare cu antigenul. Numărul „domeniilor" regiunilor constante este de cîte 1 pentru lanțurile kappa și lambda și 3 pentru lanțul gamma. Tratarea IgG cu enzime determină scindarea sa în fragmentele Fab și Fc.

Timpul mediu de înjumătățire a concentrației IgG este de 25 zile la om ca și la speciile de mamifere domestice. La taurine, această durată este de 20—25 zile, cu valori mai scăzute, în unele cazuri, pentru IgG_1 (9,6 zile) și IgG_2 (17,7 zile) (B u t t l e r, 1970). Rezultate similare au fost obținute în cazul IgG de capră.

IgG este sintetizată (îndeosebi după stadiul inițial al producerii IgM) în urma inoculării antigenelor solubile și virale ca și după primirea unor informații antigenice reprezentate de antigenele H ale germenilor Gram negativi, ale toxinelor clostridiilor și, cu intensitate comparativ redusă, față de spirochete. Izoanticorpii specifici dobîndiți față de antigenele grupelor sanguine fac de asemenea parte din clasa IgG; anticorpii fixatori de complement, opsoninele, bacteriocidinele, autoanticorpii (parțial chiar anticorpii reaginici) se încadrează în parte sau în totalitate în clasa imunoglobulinelor G.

La bovine, activitatea fixatoare de complement aparține în primul rînd subclasei IgG_1. IgG este implicată și în alte reacții antigen-anticorp ca neutralizarea toxinelor și a virusurilor, precipitarea și, în mai mică măsură, citoliza imună.

În anaplasmoza bovină, anticorpii IgG (care sînt decelabili după cei din clasa IgM) persistă cel puțin 18 luni.

IgG este dotată cu capacitatea de a traversa unele țesuturi ca mucoasa intestinală și placenta. IgG_1 serică se regăsește, ca urmare a acestei proprietăți, în colostru la majoritatea speciilor.

Imunoglobulina M este o participantă deosebit de importantă la realizarea răspunsului imun, în special în stadiul inițial al acestuia (răspunsul primar). Concentrația sa în serul sanguin se situează în jurul valorilor de 50—190 mg/100 ml la om, 250—280 mg/100 ml la taurine, 100—300 mg/100 ml la porc.

IgM este de fapt o moleculă gigant, un polimer format (la mamifere și păsări) din 5 unități subunități; fiecare dintre acestea include cîte două lanțuri grele și două lanțuri ușoare.

Structura subunităților de IgM este în mare măsură similară cu aceea a unei molecule de IgG; între lanțurile grele sînt prezente numai două punți disulfidice. Legarea lanțurilor H între ele este realizată prin legături disulfidice situate la capătul C-terminal.

Între subunitățile monomerice ale moleculei de IgM legătura este asigurată și de lanțul J (de la engl. *joining*= care unește).

Durata medie a timpului de înjumătățire a concentrației imunoglobulinei M este de 5—6 zile la om și la mamiferele domestice.

Imunoglobulina M este caracteristică răspunsului imun față de antigenele somatice ale germenilor Gram negativi și față de spirochete. Izoanticorpii naturali contra antigenelor de grup sanguin sînt predominant macroimunoglobuline, ca și anticorpii față de antigenele de tip Forssman; imunoglobulinele M se regăsesc și printre anticorpii antivirali, anticorpii fixatori de complement, opsonine, bacteriocidine și autoanticorpi.

IgM participă în mod direct la realizarea unor teste serologice printre care cele care se bazează pe fenomenele de aglutinare bacteriană, hemaglutinare, bacterioliză, neutralizare a toxinelor.

Imunoglobulina A ocupă o poziție deosebită între proteinele implicate în răspunsul imun, atît prin sintetizarea sa sub mai multe forme cît și datorită faptului că este secretată cu precădere la nivelul unor suprafețe ale mucoaselor.

Scanned with OKEN Scanner

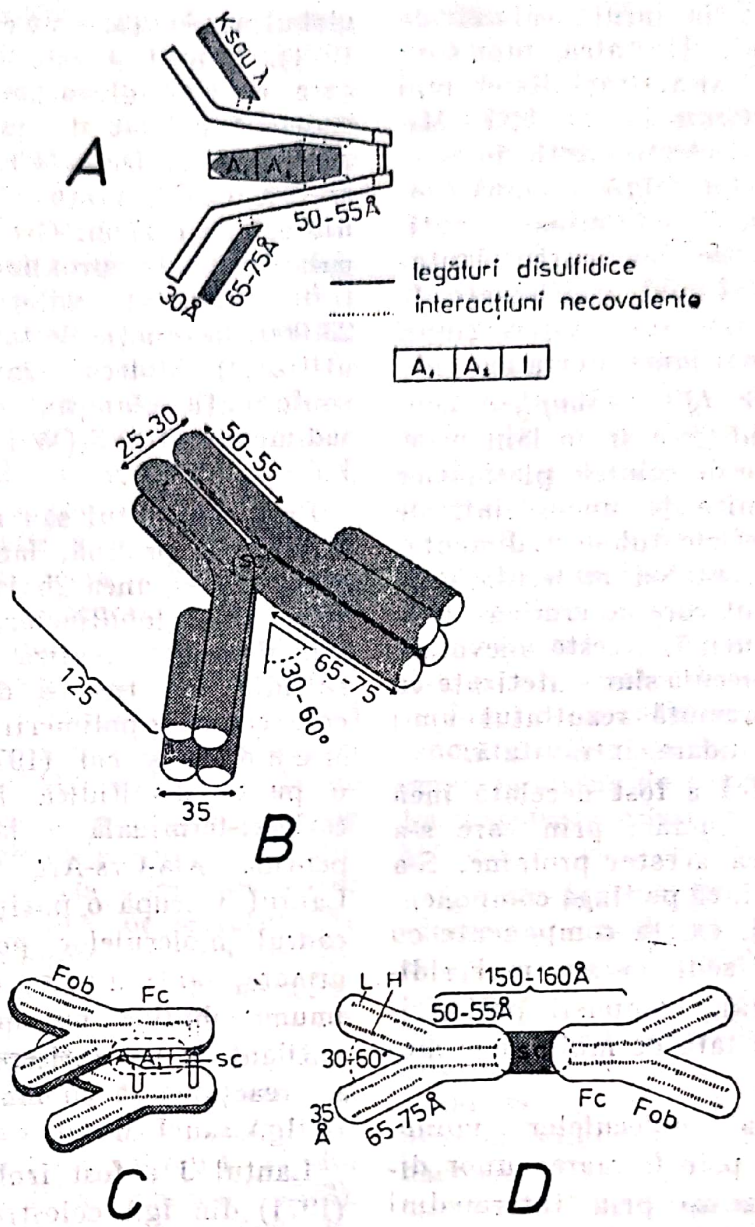


Fig. 18 — Model de IgA de secreție (după: A — Brandtzoeg; B — van Munster; C și D — Tomasi și Grey)

Celulele care secretă IgA se găsesc în special în țesuturile situate sub mucoasa respiratorie și intestinală.

Concentrația IgA în serul sanguin este de 140—420 mg/100 ml la om, 10—120 mg/100 ml la taurine, 10—200 mg/100 ml la porc.

Durata medie a timpului de înjumătățire a IgA este de 5—6 zile, atît la om cît și la mamiferele domestice.

Imunoglobulina A există sub mai multe forme structurale (fig. 18). Astfel, *IgA monomerică* se găsește în serul sanguin și reprezintă pînă la 20% din IgA de secreție. Este constituită din două lanțuri grele și două lanțuri ușoare. Au fost decelate două subclase de IgA: IgA_1 și IgA_2, prima fiind net majoritară (peste 90% din totalul moleculelor IgA). Greutatea sa molecu-

bară se situează în jurul valorii de 160 000 daltoni. Unitatea monomer are forma de Y și aceleași dimensiuni electronmicroscopice ca și IgG. Migrează în cîmpul electroforetic în zona beta-2-globulinelor. IgA umană include cel puțin 9 determinanți antigenici, dintre care doi aparțin lanțurilor ușoare, doi sînt dependenți de configurația datorată interacțiunii L-H iar 5 proprii lanțurilor alfa.

Moleculele de IgA incompletă constau din un lanț greu și un lanț ușor, fiind sintetizate de celulele plasmatice tumorale întîlnite la unele linii de șoarece. Au coeficientul de sedimentare 3,9 S și greutatea moleculară de 61000-68000, fapt care determină eliminarea lor prin urină. Aceste adevărate jumătăți de moleculă sînt sintetizate ca atare și nu reprezintă rezultatul unui fenomen de scindare intravitală.

IgA polimerică a fost decelată încă de la primele lucrări prin care s-a urmărit izolarea acestei proteine. S-a constatat, astfel, că pe lîngă componenta majoră, 7 S, există componente cu coeficienții de sedimentare mai ridicați. În general, compușii polimerizați predomină față de moleculele monomere.

Polimerizarea moleculelor monomer, de obicei prin formarea unor dimeri, se realizează prin intermediul legăturilor disulfidice, de fapt o manifestare cu caracter general a moleculelor de IgA care au tendința de a se uni cu alte molecule proteice serice. Grupările cisteinice implicate în aceste cuplări se află în fragmentul Fc. Prin microscopie electronică s-a demonstrat că dimerii de IgA sînt structuri în formă de „dublu Y".

Lanțul J a fost descris la iepure și om de Halpern și Koshland (1970), fiind pus în evidență în IgA de secreție și în IgA-polimer, dar nu și în IgA-monomer. Ulterior, această componentă a fost decelată și la imunoglobulina M (Mestecki și col., 1971). Lanțul J este o glicoproteină care conține glucozamină și are un conținut ridicat de acid glutamic și acid aspartic. După Niedermeier și col. (1972) lanțul J conține 7,6% hidrați de carbon. Greutatea sa moleculară este de aproximativ 20 000 (au fost comunicate valori de 15 000 și 23 000, în funcție de tehnicile de lucru utilizate). Molecula lanțului J are o conformație alungită și constanta de sedimentare 1,28 S (Wilde și Koshland, 1973).

Prin conținutul său relativ mare în cisteină și prolină, lanțul J se aseamănă cu regiunea „balama" din molecula imunoglobulinelor. Existența cisteinei permite realizarea punților disulfidice cu fiecare dintre unitățile care compun polimerii IgA sau IgM. Mendez și col. (1973) au localizat o punte disulfidică între porțiunea carboxi-terminală a lanțului alfa și peptida Ala-Cys-Arg a lanțului J. Lanțul J ocupă o poziție „ascunsă" în cadrul moleculelor polimerizate; ca urmare, antiserurile contra acestor imunoglobuline nu includ anticorpi antilanț J, iar antiserurile antilanț J nu reacționează cu moleculele intacte de IgA sau IgM.

Lanțul J a fost izolat de Zikan (1971) din IgA colostral porcin; între acesta și componentul corespondent uman există similitudini în privința structurii primare. Autorul a decelat lanțul J și în imunoglobulina M din serul de porc. Aceeași componentă a fost decelată la cîine (Kahoe și col. 1972), bovine (Buttler, 1971). Vaerman și col. (1974) au demonstrat reacții încrucișate tipice între lanțul J uman, pe de o parte și lanțurile J de cîine, pisică, bou, capră, oaie, porc, cal, arici, cobai, șobolan, șoarece și găină. Absorbția antiserurilor respective cu lanț J uman a determinat anularea reacțiilor. Aceste

Scanned with OKEN Scanner

rezultate confirmă existenţa unor omologii între lanţurile J de la diferite specii în privinţa compoziţiei în aminoacizi ca şi ipoteza după care această polipeptidă păstrează o evidentă stabilitate în timpul evoluţiei filogenetice. Lanţul J realizează şi menţine asamblarea moleculelor polimerizate de IgA şi IgM prin punţi disulfidice (fig. 19). În cadrul IgA, componenta secretorie şi lanţul J sînt legate prin punţi disulfidice iar lanţul J poate media legarea componentei secretorii (Koshland şi Wilde, 1974, Mestecki şi col., 1974).

IgA de secreţie a fost decelată în lacrimi, salivă, secreţii nazale, colostru, lapte etc. şi reprezintă un dimer al IgA care include, pe lîngă lanţul J, o subunitate proprie denumită *componentă secretorie*. Formula sa este deci $(IgA)_2$. J.SC şi este aplicabilă pentru această proteină la toate speciile de mamifere şi păsări. Chiar în cazurile în care imunoglobulina dominantă din lapte este IgG, aşa cum este cazul rumegătoarelor, IgA de secreţie este secretată într-o formă polimerizată (dimer cu lanţ J şi componentă de secreţie (Heimer şi col. 1969, Mach şi col., 1969; Butler, 1971). Componenta secretorie a fost izolată din laptele de vacă încă din anul 1967 (Groves şi Gordon) şi din laptele de căţea (Vaerman, 1973). Această componentă a mai fost decelată şi caracterizată la cîine (Reynolds şi Johnson, 1971; Vaerman, 1973), oaie şi capră (Pahud şi Mach, 1970), porc (Bourne, 1969, Bourne şi col., 1971), cal (Pahud şi Mach, 1972).

Componenta secretorie liberă poate fi izolată din secreţiile mamare şi parotidă prin precipitare, cromatografie pe coloană şi gelfiltrare. Greutatea sa moleculară este 70 000—75 000 şi are un conţinut ridicat în hidraţi de carbon.

Structura IgA de secreţie (S IgA) este determinată de faptul că este un dimer care include două unităţi suplimentare — lanţul J şi componenta secretorie. Ca urmare, greutatea sa moleculară este de aproximativ 400 000, cu valori care variază între 370 000 şi 415 000 la speciile de animale domestice (cîine, bou, oaie, capră, cal, iepure). Constanta de sedimentare, determinată la om, cîine, bou, este de 10,8—11,8 S. Mobilitatea electroforetică a SIgA este într-o oarecare măsură mai lentă decît cea a IgA din ser. SIgA este mai rezistentă decît IgA serică faţă de enzimele proteolitice.

Imunoglobulina A este sintetizată în special în urma aplicării locale a antigenului, la nivelul mucoasei respiratorii sau digestive (intestinul subţire). S-a constatat, astfel, că după imunizarea pe cale orală se formează IgA, dar şi alte clase de imunoglobuline, în funcţie de antigenul folosit. Acest fenomen este important pentru înţelegerea modului de acţiune a antigenelor vaccinale administrate prin aerosoli sau pe cale orală.

IgA are proprietatea de a neutraliza virusurile, probabil prin realizarea complexelor antigen-anticorp inactive. La nivelul mucoaselor, imunoglobulina A este implicată în apărarea faţă de diverse antigene nocive cu care formează agregate stabile care sînt ulterior eliminate. Activitatea antibacteriană a acestei imunoglobuline nu este încă suficient demonstrată, iar participarea sa la realizarea unor reacţii antigen-anticorp este limitată.

Imunoglobulina D, recent decelată şi studiată la om, are o structură asemănătoare cu IgG, fiind constituită din două lanţuri H şi două lanţuri L (kappa sau lambda). Are greutatea moleculară de 170 000—180 000 şi coeficientul de sedimentare 6,6 S. Conţine 12% polizaharide.

Celulele care sintetizează imunoglobulina D au fost evidenţiate în tonsile şi unii ganglioni limfatici, mai rar în splină şi mucoasa intestinală. IgD a fost decelată pe suprafaţa limfocitelor de tip B, celule care s-a demon-

Scanned with OKEN Scanner

strat că produc această imunoglobulină.

Concentraţia în ser a IgD este, la om, de 0,3—30 mg/100 ml. Timpul mediu de înjumătăţire a fost determinat la o durată medie de 2—3 zile.

Rolul biologic al acestei imunoglobuline nu este încă bine cunoscut.

Imunoglobulina E reprezintă anticorpii reaginici. Cunoaşterea structurii sale se bazează în special pe studiul unor proteine mielomatoase IgE semnalate la om. Este formată din patru lanţuri (2 epsilon şi 2 kappa sau lambda), are o greutate moleculară de 180 000—200 000 şi un conţinut în glucide de aproximativ 10—12% care include hexoză, N-acetilglucozamină, acid acetilneuraminic şi L-fucoză. În prezent, sînt cunoscute secvenţele de aminoacizi, în special pentru lanţul greu ε (Bennich şi von Bahr-Lindström, 1974). Cercetările cu privire la regiunile cunoscute şi variabile au evidenţiat similitudini ale lanţului greu al IgE cu lanţurile grele ale IgD şi IgG. Prin poziţia punţilor disulfidice, IgE prezintă unele particularităţi care o deosebesc de toate celelalte imunoglobuline.

IgE are o mobilitate electroforetică γ_1; coeficientul de sedimentare, determinat prin ultracentrifugare în gradient de densitate, este 8 S.

La trecerea prin coloană de Sephadex este eluată în partea ascendentă a fracţiunii ce conţine IgG. Prin cromatografie pe DEAE celuloză este eluată de tamponul 0,025 M.

Activitatea de fixare a moleculelor de IgE la mastocite este realizată de către fragmentul Fc. După Bennich şi von Bahr-Lindström (1974) cuplarea IgE la mastocit se realizează prin două situsuri diferite; dintre acestea, unul are rolul de recunoaştere şi reacţionează cu receptorii de membrană ai celulelor; al doilea situs nu are o specificitate celulară bine definită. Se admite că IgE se fixează la suprafaţa mastocitelor sau a bazofilelor în condiţii care asigură posibilitatea ca o moleculă de antigen să se cupleze cu două molecule imunoglobulinice, rezultînd punţi IgE-Ag-IgE.

Fragmentul Fab este constituit din lanţuri uşoare şi porţiuni Fd ale lanţului epsilon care include determinarea antigenică idiotipică.

Anticorpii din clasa IgE aglutinează globulinele roşii învelite cu antigen. IgE nu participă la realizarea testului de fixare a complementului efectuat după procedeul clasic, chiar în cazul aplicării unei variante mai sensibile a acestuia (Ishizaka şi col., 1970). Aplicînd metoda lui Osler şi col. (1969), s-a constatat că IgE agregată a fixat complementul în cazul incubării cu complement de cobai sau de om la 37°C. Cea mai importantă proprietate biologică a IgE constă în sensibilizarea ţesuturilor omoloage. Această proprietate a fost demonstrată prin reacţiile inverse tip Praussnitz-Küstner (Ishizaka şi Ishizaka, 1968).

Anticorpii IgE sînt implicaţi în realizarea fenomenului de anafilaxie pasivă cutanată. Sensibilizarea cutanată de către anticorpi persistă o lungă perioadă de timp, fapt explicat prin persistenţa IgE la locul inocularii intracutane (Ishizaka şi Ishizaka, 1971). Imunoglobulina E are capacitatea de a sensibiliza tractusul respirator (Ishizaka şi col., 1970), fenomen demonstrat şi *în vitro* pe culturi celulare de pulmon de maimuţă şi de om.

Concentraţia IgE este redusă — în medie 0,3 μg/ml la om. Ca urmare, evidenţierea sa este posibilă numai prin metode foarte sensibile, ca testul radioimunologic. Este imunoglobulina catabolizată cel mai rapid dintre cele cinci descrise, avînd în acelaşi timp cea mai scăzută rată de sinteză. Nivelul IgE este micşorat evident în stările de hipogammaglobulinemie. Cea mai mare proporţie de molecule IgE sînt fixate pe celulele de elecţie — mastocitele şi bazofilele.

Scanned with OKEN Scanner

Prin testul de imunofluorescenţă s-a constatat că celulele care sintetizează IgE sînt localizate la om în special în tonsile, ganglionii limfatici bronhici şi peritoneali, mucoasele respiratorii şi gastrointestinale. Rezultă că această imunoglobulină se formează local (ca şi IgA) participînd şi în acest fel la producerea afecţiunilor alergice. A fost pusă în evidenţă în secreţiile traheobronhice, colostru, urină.

N o g e l şi col. (1977) demonstrează formarea anticorpilor IgE la om în urma vaccinării de rapel cu vaccinurile antidifteric şi antitetanic.

În infestaţiile parazitare creşte concentraţia IgE, fapt pus în evidenţă în condiţii experimentale şi la indivizii infestaţi cu ascarizi, capilarii, fasciole, trichinele etc. În acelaşi timp, a fost constatată mobilizarea mastocitelor şi degranularea acestora.

J o n e s şi O g i l v i e (1971) au demonstrat rolul protector al serului de animal infestat faţă de *Nipostrongylus brasiliensis*, manifestat prin eliminarea mai rapidă a helminţilor.

Prezenţa anticorpilor din clasa IgE la animalele infectate a fost demonstrată prin testul de anafilaxie pasivă cutanată, fără ca anticorpii IgG_1 şi IgE să fie decelaţi în ser. Se poate presupune deci că în astfel de situaţii, imunoglobulina E intervine în urma formării sale locale, în ţesuturile limfoide libere din mucoase, prin mărirea permeabilităţii vasculare.

V. 5. Aspecte particulare ale funcţiilor imunoglobulinelor la animale

V. 5.1. Răspunsul imunologic la fetus şi la animale nou-născute

Capacitatea animalelor tinere de a dezvolta răspunsuri imunologice a fost intens studiată, îndeosebi în legătură cu prezenţa sistemului celular al imunităţii şi cu elaborarea de către acesta a imunoglobulinelor specifice. Aceste cercetări s-au referit, în bună măsură, la stadiul de fetus şi la animalele nou-născute, în primele zile şi săptămîni de viaţă.

Importanţa practică a cunoaşterii acestor fenomene este indiscutabilă. Realizarea metodelor de profilaxie specifică a unor afecţiuni ale tineretului, indiferent de specie, impune studierea vîrstei optime, a dozelor, a căilor de inoculare şi a altor parametri în funcţie de capacitatea de răspuns a animalului.

După G o o d (1971, cit. de S c h u l t z , 1973) celulele limfoide precursoare provin din sacul vitelin embrionar; migrînd de la acest nivel, ele ajung în ficatul fetal de unde migrează în timus sau în măduva osoasă. În continuare se dezvoltă cele două linii de celule imunocompetente- T şi B. S c h u l t z (1973) consideră că popularea ficatului fetal bovin cu celule precursoare are loc la vîrsta de 10—60 zile; ulterior, transferul către timus se realizează la 40—80 zile iar către măduva osoasă la 50—80 zile şi în continuare.

Cercetările cu privire la dezvoltarea capacităţii de a reacţiona adecvat faţă de antigene străine au demonstrat că la fetuşii bovini limfocitele sînt decelabile în timus în ziua a 42-a de gestaţie, în ziua a 45-a în sîngele periferic, în ganglionii limfatici în ziua a 48-a, în măduva osoasă în ziua a 55-a, în splină în ziua a 59-a şi în ţesutul limfoid intestinal în ziua 110 (S c h u l t z şi col. 1971, 1973).

Aceiaşi autori (1973) au găsit corpusculi Hassal în timus la fetuşi bovini în vîrstă de 65 zile; greutatea timusului raportată la greutatea corporală (indicele timic) creşte treptat pînă

Scanned with OKEN Scanner

la vîrsta de 205—220 zile după care scade, în special în perioada perinatală. Aceste date nu au fost confirmate de alţi autori, după care creşterea indicelui timic se înregistrează pînă la naştere. Ganglionii limfatici pot fi evidenţiaţi începînd cu vîrsta fetuşilor de 60 zile; la 100 zile sînt formaţi ganglionii prescapulari, femurali, poplitei, retromamari, mediastinali, mezenterici; limfocitele sînt în această perioadă în număr redus, zonele corticală şi medulară nu sînt diferenţiate; centrii germinativi nu sînt formaţi în aceste stadii iniţiale ale dezvoltării.

La vîrsta de 135—175 zile ţesutul limfoid începe să fie format în tonsile.

În sîngele periferic, după apariţia limfocitelor la 45 zile, se observă primele leucocite la 100—120 zile (Hubbert şi Hollen, 1971).

Celulele care sintetizează IgM au fost decelate prin testul de imunoflourescenţă în splină la fetuşi de 59 zile; IgG a fost pusă în evidenţă numai în ziua 145 (Schultz şi col. 1973).

Olson şi Waxler (1977) constată prezenţa celulelor care sintetizează IgM, IgG_1 şi IgG_2 la fetuşi bovini în intestinul subţire, splină şi unii ganglioni limfatici. La viţeii nou-născuţi primele celule imunocompetente sînt cele care sintetizează IgM (Porter şi col. 1972).

În mucoasa gastrointestinală şi în ganglionii limfatici regionali ai fetuşilor bovini vaccinaţi anticolibacilar, Conner şi col. (1977) au remarcat producerea locală a imunoglobulinelor G,M precum şi a anticorpilor specifici.

Imunoglobulinele au fost decelate în serul fetuşilor bovini care nu au fost stimulaţi antigenic, aplicîndu-se în acest scop metode ca imunoelectroforeza şi testul radioimunologic.

Kniazeff şi col. (1967) au decelat concentraţii relativ ridicate de imunoglobuline în serul fetuşilor în vîrstă de 4—6 luni. Schultz şi col. (1971) au stabilit că IgM şi IgG sînt prezente în probele de ser fetal, la un număr mai mare de indivizi în cazul determinării prin testul radioimunologic, la vîrsta de 130—145 zile. Date asemănătoare au fost obţinute şi de alţi autori. Astfel, Rossi şi col. (1976) constată prezenţa IgM şi IgG în serurile fetuşilor bovini în vîrstă de 90—240 zile. Imunoglobulina A a fost pusă în evidenţă de Schultz (1973) la un număr redus de fetuşi bovini. Şi alţi autori sînt de părere că IgA este prezentă în serul fetal (Porter şi col., 1968; Penhale şi col; 1970).

La fetuşi bovini în vîrstă de 78—240 zile au fost pusă în evidenţă capacitatea blastogenică a limfocitelor în urma stimulării cu mitogeni ca fitohemaglutinina, PWM şi concanavalina A. Pe măsură creşterii în vîrstă a fetuşilor a fost observată o accentuare a activării limfocitelor de către concanavalina A şi PWM, mai puţin de către PHA. După vîrsta de 90 zile majoritatea fetuşilor au prezentat răspunsuri limfocitare blastogenice evidente la PWM, cel puţin 50% la concanavalina A (Con A) şi numai 15% la PHA (Renshaw şi col. 1977). Rezultă existenţa unor diferenţe notabile între fetuşi precum şi a unei separări marcate a funcţiilor celulare imune *in vitro*. În acelaşi timp, este remarcabilă precocitatea dezvoltării populaţiilor de limfocite imunologic active în dezvoltarea ontogenetică a bovinelor. Comportarea contradictorie a limfocitelor fetale bovine faţă de Con A şi PHA se explică prin lipsa de omogenitate a subpopulaţiilor T şi B de limfocite. La fetusul ovin, primele limfocite cu determinanţi imunoglobulinici de membrană au fost evidenţiate la vîrsta de 52 zile; proporţiile relative ale acestor celule au crescut în perioadele 78—87 zile şi după 117 zile (Symons şi Binns, 1975).

Fetusul bovin are capacitatea de a reacţiona faţă de antigene microbiene sau nemicrobiene, la vîrsta de aproximativ 180 zile (Osborn şi col., 1974), după Hendrick (1971) chiar de la 100 de zile. Aceste date

Scanned with OKEN Scanner

demonstrează existenţa unui sistem imunitar format încă în viaţa intrauterină la această specie.

La 90—120 zile, se obţin răspunsuri specifice faţă de virusurile PI-3, IBR şi BVD (printre alţii, Kahrs şi col., 1970; Scott, 1973), la aproximativ 100 zile faţă de *Leptospira*, *Brucella*, *Anaplasma* şi feritină. Fetuşii cei mai tineri la care a fost evidenţiată o activitate bactericidă, ca şi prezenţa complementului, erau în vîrstă de 70 zile.

După vîrsta de 250 zile au fost decelate răspunsuri specifice faţă de virusul bolii limbii albastre, parvovirusuri, *Coxiella burnetti*, fagi şi alte antigene.

Escherichia coli induce formarea anticorpilor specifici la fetuşi bovini (Conner şi col., 1973, Gay, 1975, Olson şi Waxler, 1976, 1977).

Folosind testul de imunofluorescenţă, Wamukoya şi Conner (1976) au găsit plasmocite formatoare de anticorpi la viţeii vaccinaţi cu *E. coli* cu 10—50 zile înainte de naştere şi sacrificaţi în primele 12 ore de la naştere, fără a li se administra colostru. Celulele imunofluorescente au fost observate în intestinul subţire, ganglionii limfatici mezenterici şi în splină; imunoglobulinele sintetizate aparţineau claselor IgM şi IgG_2. Gibson şi Zemjani (1973) au demonstrat, la rîndul lor, capacitatea imunoformatoare a fetuşilor bovini care produc anticorpi faţă de feritină (în luna a 4-a de gestaţie), virus BVD (luna a 6—9-a) *Brucella* (luna a 4-a), virus IBR (luna a 5-a). Începînd din a 200-a zi de gestaţie, fetuşii bovini au produs anticorpi faţă de virusul BVD, asociaţi cu imunoglobinele G şi M (Braun şi col., 1973).

Capacitatea de răspuns imunologic a fetusului şi a animalului tînăr are consecinţe practice importante. S-a demonstrat astfel că vaccinarea fetuşilor (Gay, 1971, Conner şi col., 1973, Olson şi Waxler, 1976, Wamukoya şi Conner, 1976) sau a viţeilor (Allen şi Porter, 1975, Porter şi col. 1975) ar putea fi folosită pentru prevenirea unor boli microbiene. Cu toate acestea, Conner şi col. (1977) atrag atenţia asupra unor accidente în urma aplicării vaccinării fetuşilor.

Prezenţa imunoglobulinelor a fost constatată şi în cazul *fetuşilor ovini* de către Munday şi Corbould (1975); cazurile cercetate proveneau de la fetuşi infectaţi în timpul vieţii intrauterine cu *Toxoplasma gondii*. Ca urmare, imunoglobulinele purificate din clasa IgG aveau proprietatea de anticorp faţă de *Toxoplasma gondii*, pusă în evidenţă prin testul de imunofluorescenţă.

Sawyer şi col. (1978) stabilesc că la fetuşii ovini limfocitele mature pot fi decelate din ziua a 32-a de gestaţie în timp ce leucocitele polinucleare neutrofile sînt prezente numai la 123 zile. Imunoglobulinele G şi M au fost dozabile după 56 şi respectiv 77 zile de gestaţie, menţinîndu-se la niveluri constante pînă la naştere (valori de 0,20 mg/ml pentru ambele proteine); la fetuşii infectaţi experimental aceste valori au fost evident crescute. S-a demonstrat, de asemenea, că fetuşii ovini sintetizează anticorpi hemaglutinanţi şi imunoglobuline M, începînd de la vîrsta de 70 zile, în urma imunizării cu flagelina polimerizată obţinută din *Salmonella typhimurium*. La fetuşii de 120 zile şi mai mari au fost sintetizate şi imunoglobuline G (Fahey, 1977).

La *fetuşii de porc* în vîrstă de 80 zile nu a fost decelată prezenţa imunoglobulinelor G, A şi M (Senft şi col., 1975). Cu toate acestea, este stabilit faptul că imunocompetenţa fetusului porcin poate fi pusă în evidenţă încă din a 60-a zi de gestaţie. Începînd din a 30-a zi, cînd timusul este format, are loc procesul de diferenţiere limfoblastică; în ziua a 40-a de gestaţie se observă primele formaţiuni limfoide, splina este populată cu limfocite după 57—88 zile, în sînge se găsesc limfocite după 92 zile de la concepţie. Se pare că pri-

Scanned with OKEN Scanner

mele răspunsuri imunitare, de intensitate redusă pot fi observate după cel puțin 45—50 zile de gestație (R o u z e, 1976). Corelate cu aceste constatări, sînt rezultatele obținute de B o u r n e și col. (1974) care au izolat și caracterizat imunoglobulinele G (7 S, 19 S, 4 G) și SIgA de la fetuși în vîrstă de peste 55 zile. Pe de altă parte, B i n n s (1973) consideră că fetusul porcin devine imunocompetent la vîrsta de 70 de zile. B i n n s și S y m o n s (1974) au constatat că proporția celulelor limfoide fetale din sînge cu receptori de suprafață pentru Ig crește rapid între zilele a 70-a și a 80-a de gestație, fenomen care coincide cu apariția primelor indicii ale imunocompetenței (capacitatea de a răspunde specific față de antigenele inoculate fetușilor). Chiar la vîrsta de 59 zile inocularea unui antigen determină creșterea numărului de celule Ig pozitive.

A l l e n și P o r t e r (1977) au pus în evidență celule formatoare de imunoglobuline M, A și G în intestinul subțire la purcei în vîrstă de 2 zile—12 săptămîni. Primele celule care au fost decelate sînt cele care sintetizează IgM, duodenul fiind fragmentul cu cea mai intensă activitate în această direcție. V i o r și col. (1975) au pus în evidență celule care sintetizează IgG, la purcei nou-născuți, în splină, intestin și ganglionii limfatici. Dezvoltarea formațiunilor imunocompetente a fost evidentă la purceii în vîrstă de 12 zile, în special în intestinul subțire, procesul fiind deosebit de intens la purceii de 21 zile.

La purceii care nu au supt colostru, o serie de cercetători au evidențiat prezența IgG în ser (maximum 225 micrograme/ml) dar nu și a IgA și IgM (S e n f t și col., 1975, V i o r și col., 1975).

După primirea colostrului, concentrațiile Ig în serul de purcel nou-născut cresc considerabil. Pentru IgG, valorile maxime sînt de 31,6 mg/ml la 18 ore; IgM are concentrația cea mai mare, 1,82 mg/ml, iar IgA 3,02 ml/mg la 30 ore după naștere. Durata medie a persistenței acestor Ig este de 7,4 zile pentru IgG, 5,7 zile pentru IgA și 3,2 zile pentru IgM (S e n f t și col. 1975).

Purceii nou-născuți au capacitatea de a dezvolta răspunsuri imune față de numeroase antigene (bacterii, virusuri, fagi, proteine). Totuși, o serie de fenomene fiziologice în perioada neonatală inhibă aceste răspunsuri: scăderea numărului de limfocite în urma creșterii concentrației corticosteroizilor și prezența anticorpilor maternali primiți prin colostru (R o u z é, 1976).

La găină, în bursa lui Fabricius sînt prezente, încă din primele zile de viață, celule care devin imunocompetente în urma stimulării cu un antigen corpuscular de tipul suspensiei de *Brucella abortus*. Inocularea directă a antigenului în țesutul bursal al puilor, imediat după ecloziune, determină o creștere a răspunsului față de acest antigen, în urma unei inocuări ulterioare pe cale intravenoasă (M a t s u d a și col., 1976). Celulele care sînt stimulate de alte antigene, ca *Salmonella pullorum*, au fost decelate numai după vîrsta de 10 zile.

În bursă și în alte organe embrionare de găină, au fost puse în evidență celule avînd proprietatea de a fixa mai multe antigene; numărul acestor celule a rămas relativ constant în timpul dezvoltării embrionare (D e c k e r și col., 1974). Timusul este primul organ limfoid complet dezvoltat la embrionii de găină, urmat de bursa lui Fabricius între 12 și 21 zile (I a n k o v i c și col., 1975). Y a m a m o t o și col. (1977) nu decelează celule formatoare de anticorpi în intestin, bursa lui Fabricius, splină și timus la embrionii de găină în vîrstă de 15 zile. La puii de o zi, celulele bursale sintetizează IgM, IgG și IgA iar celulele limfoide intestinale IgM. După 3—7 zile de la ecloziune, se observă celule formatoare de IgA în intestin, timus și splină precum și un număr mic de celule care

Scanned with OKEN Scanner

sintetizează IgG în mucoasa intestinală.

Din cercetările efectuate de Kincade şi Cooper (1973) şi Yamamoto şi col. (1977) rezultă că celulele formatoare de IgA din bursă pot fi evidenţiate după ce embrionii au împlinit vîrsta de 18 zile, pînă la ecloziune. Kincade şi Cooper (1971) au evidenţiat celule care produc IgM în bursa embrionilor de 14 zile.

În serul sanguin, imunoglobulina A a fost decelată numai după 12 zile de la ecloziune (Martin şi Leslie, 1973). Transferul imunoglobulinelor din serul de găină în gălbenuş a fost demonstrat de Rose şi col. (1974), care au pus în evidenţă în gălbenuş două subclase de IgG; IgA şi IgM, absente în vitelus şi serul sanguin al puilor de o zi au fost decelate în albuş, lichidul amniotic şi tractusul digestiv al embrionilor de 19 zile.

V. 5.2. Transferul imunoglobulinelor prin colostru şi lapte

În secreţiile lactate bovine principala componentă imunoglobulinică este IgG (Steck, 1962, Rice şi Carrière, 1969 şi alţii), spre deosebire de om, iepure şi şoarece la care predomină imunoglobulina A. S-a demonstrat că imunoglobulina G_1 este transferată ca atare, nemodificată, prin epiteliul glandei mamare din serul sanguin în colostru şi lapte (Pierce şi Feinstein, 1965; Murphy şi col., 1965; Sullivan şi col., 1969; Newby, 1975); prin acest proces se realizează şi o concentrare a IgG_1, ca şi a altor imunoglobuline. O serie de autori au constatat că în perioada premergătoare fătării are loc procesul selectiv de transfer al IgG_1 la vacă (Branden şi col. 1971; Sasaki şi col. 1976), capră (Micuşan şi Borduas, 1976) şi oaie (Watson şi Lascelles, 1973). Transferul începe cu 1—2 săptămîni înainte de fătare şi este însoţit de o scădere a concentraţiei IgG_1 în ser. Sasaki şi col. (1976) au stabilit că în aceeaşi perioadă se accentuează biosinteza IgG_1 (în special cu 1—3 zile înainte de fătare) şi se scurtează evident durata „vieţii" IgG_1 seric. Milon şi Geral (1978) confirmă aceste date, constatînd că în perioada care precede fătarea la oaie are loc o scădere accentuată a anticorpilor serici anti-chlamidieni fixatori de complement. Au fost constatate diferenţe ale conţinutului în imunoglobuline în colostrul vacilor în funcţie de lactaţie; astfel, concentraţia IgG creşte odată cu vîrsta iar dispariţia acestei Ig din colostru este mai rapidă la primele lactaţii (Oyeniyi şi Hunter, 1978). IgA are o concentraţie mai mare în secreţiile lactate decît în serul sanguin. Imunoglobulina M este decelată în colostru şi lapte, avînd concentraţii similare celor din serul sanguin.

Pe lîngă imunoglobulinele provenite din ser, în colostru şi lapte se găsesc şi astfel de proteine sintetizate local. O serie de argumente susţin dubla origine a imunoglobulinelor prezente în lapte: evidenţierea multiplicării celulelor formatoare de anticorpi (plasmocite) în glanda mamară înainte şi după parturiţie (ca dealtfel şi după inocularea unui antigen pe cale intramamară); prezenţa în lactoser a IgA de secreţie în concentraţii care nu se regăsesc în serul sanguin, dealtfel extrem de sărac în această componentă, fapt care atestă secreţia sa locală. Diferenţele existente între proprietăţile fizico-chimice ale IgG_1 şi IgG_2 din ser şi lapte pledează, de asemenea, pentru sinteza unei părţi din aceste proteine la nivelul glandei mamare.

Încă din 1950, Campbell şi col., Porter au remarcat o intensă limfoplasmocitoză în glanda mamară, îndeosebi în perioada secreţiei colostrului. Pe de altă parte, Mach şi

Scanned with OKEN Scanner

Pahud (1971) au dovedit existenţa unei sinteze locale de IgG_1, prin culturi celulare, arătînd însă că nivelul cantitativ al acesteia este prea redus pentru a putea explica, în totalitate, prezenţa IgG_1 în colostru şi lapte.

Ca urmare a transferului din sînge şi a sintezei locale, colostrul şi laptele animalelor la care nu există un pasaj transplacentar de imunoglobuline (bovine, ovine, caprine, porcine, cabaline), sînt cu deosebire bogate în IgG (Sullivan şi col., 1969; Mach şi col., 1969; Bourne, 1969; Pahud şi Mach, 1970; Porter şi col., 1970). După Mach şi Pahud (1971), sinteza SIgA în glanda mamară la bovine este redusă în comparaţie cu alte specii, omul în primul rînd.

Colostrul de scroafă conţine imunoglobuline provenite atît prin transfer, din serul sanguin, cît şi prin secreţia locală, la nivelul glandei mamare. Astfel, IgG este în totalitate de origine serică, dar IgA şi IgM sînt sintetizate în glanda mamară în proporţii de 40 şi respectiv 85% (Rouzé, 1976).

V. 5.3. Imunitatea pasivă la animalele nou-născute

Se admite în prezent că transferul pasiv al imunoglobulinelor se realizează în mod diferenţiat în funcţie de specie (tabelul V. 1).

La primate, inclusiv la om, imunoglobulinele sînt transferate în circulaţia fetală începînd cu a şasea lună; procesul este selectiv, interesînd în special IgG_1 şi IgG_2, mai puţin IgG_3 şi IgG_4. Trecerea IgM, IgA şi IgE se realizează într-o foarte redusă măsură. Prin alăptare, copilul nou-născut nu primeşte imunoglobuline din colostru sau lapte.

La bovine (ca şi la porc, oaie, cal) concentraţia ridicată a imunoglobulinelor în colostru şi lapte este însoţită de permeabilitatea mucoasei intestinale a viţeilor nou-născuţi; deşi această permeabilitate este de scurtă durată (cel mult 24—36 ore), imunoglobulinele primite pasiv prin colostru traversează bariera mucoasei intestinale şi trec în circuitul sanguin (Pierce şi Feinstein, 1965, Kraehenbuhl şi Campiche, 1969, Simpson-Morgan şi Smeaton, 1972 şi alţii).

În schimb, la şoarece şi şobolan, absorbţia intestinală a Ig continuă timp de aproximativ 14 zile după naştere.

Tabel V.1

Căile de transfer pasiv al imunoglobulinelor de la mamă la fetus sau animal nou-născut

Animale	Căi de transfer		
	Sac vitelin	Placenta	Colostru şi/sau lapte
Păsări	+		
Rozătoare şoarece, şobolan	+	—	+ (16—20 zile)
Iepure	+	—	(+)
Vacă, oaie, capră, porc	—	—	+ (36 ore)
Primate	—	+	(+)

(+)=Imunoglobulinele sînt prezente în lapte şi colostru şi pot fi active în lumenul intestinal la animalul nou-născut, deşi ele nu trec în circulaţie.

Absorbția se realizează prin celulele epiteliale care, la animalele nou-născute, prezintă membrane foarte invaginate (Moon, 1972, 1975; Rodewald, 1973); moleculele imunoglobulinice sînt absorbite printr-un proces de pinocitoză, urmat de formarea unor vezicule și transportul acestora către membrana bazală a celulelor unde are loc pinocitoza inversă. Ig sînt colectate de sistemul limfatic și pătrund în circuitul sanguin prin canalul toracic. Încheierea perioadei scurte de absorbție fiziologică este marcată prin înlocuirea celulelor epiteliale intestinale cu celule mature; totuși, Moon și Joel (1975) au demonstrat că acest proces de înlocuire continuă la vițel și miel mult timp după primele 48 ore. Realizarea absorbției intestinale se explică și prin absența enzimelor proteolitice (capabile să scindeze moleculele intacte de Ig) în primele 24—48 ore după naștere (Lustermann și Günther, 1977). Realizarea unui aport de Ig prin colostru în prima perioadă este de o deosebită importanță avînd în vedere că, spre deosebire de om, rumegătoarele, ca și porcinele, nu primesc imunoglobuline materne în viața intrauterină.

După unii autori (Fey, 1971, Penhale și col., 1973) imunoglobulina M este absorbită în intestinul vițeilor în mai mică măsură decît IgG, fapt care se explică prin greutatea sa moleculară și prin timpul mai scurt de absorbție (16 ore, față de 21 ore la IgA și 27 ore la IgG). Alți cercetători nu constată existența unui transfer selectiv la această specie (Pierce și Feinstein, 1965; Brandon și col., 1971, Husband și col., 1972); Stott și Fenee (1978) au constatat că absorbția IgM variază invers proporțional în funcție de cantitatea de colostru ingerată.

Serul fetal și cel al vițeilor nou-născuți care nu au primit colostru, nu conține imunoglobuline sau acestea pot fi decelate numai prin metode sensibile, în cantități extrem de reduse (Micușan și Buzilă, 1965; Popovici și Jurencova, 1966; Baglioni și Fioretti, 1967; Jones, 1967; Klaus și col., 1969; Rice și Carrière, 1969; Stone și Gitter, 1969, 1970; Carroll și Crenshaw, 1976). Urmărind evoluția concentrației imunoglobulinelor la viței în vîrstă de 0—28 zile, Vior și col. (1973) constată că la animalele nou-născute aceste proteine nu sînt puse în evidență prin imunoelectroforeză, imunodifuziune dublă sau de tip Mancini și nici prin testul rapid de precipitare cu sulfat de zinc. Această situație se explică prin impermeabilitatea placentei care, la bovine ca și la alte rumegătoare, este de tip sindesmochorial.

Klaus și col. (1969) au constatat, totuși, prezența IgG (în concentrație de 2 mg/ml) și a IgM (0,1 mg/ml); alți autori au găsit urme de Ig la viței înainte de a suge colostru (Pierce 1955, McCoy și col., 1967). Rezultate similare obțin Mohendra și Merriman (1971) care evidențiază imunoglobulinele G și M la viței înainte ca aceștia să primească colostru; autorii nu decelează IgA la astfel de animale. Pe de altă parte, Smith și Ingram (1966) au demonstrat că albumina serică umană este imunogenică pentru viței în vîrstă de o zi, fapt care atestă existența, încă în acest stadiu de dezvoltare ontogenetică, a unui sistem imunitar suficient de dezvoltat.

În urma determinării concentrațiilor IgG_1, IgG_2, IgM și IgA în canalul toracic la viței nou-născuți care au supt colostru s-a constatat că moleculele IgG se absorb în aceeași măsură ca și macropolimerii IgM (Brandon și Lascelles, 1971). Rezultate similare au fost obținute și la porc (Porter, 1969; Martinsson și Jönsson, 1975), miel și mînz (Jeffcott, 1971, 1974).

Imunoglobulinele pot fi dozate în serul sanguin al vițeilor în primele

Scanned with OKEN Scanner

ore după naştere şi după primirea colostrului (Micuşan şi Buzilă, 1965, Popovici şi Jurencova, 1966; Schimmel, 1966), atingînd valori maxime după 6—24 ore (Schoenaers şi Kalckenbeeck, 1963; Popovici şi Jurencova, 1966; Klaus şi col., 1969). În perioada 0—28 zile concentraţiile maxime ale imunoglobulinelor la viţei sînt puse în evidenţă în prima zi, în continuare înregistrîndu-se valori apropiate dar situate pe o curbă descendentă pînă la 3 săptămîni de viaţă (Vior şi col., 1973).

În urma izolării imunoglobulinelor serice de la viţei s-a constatat că acestea sînt identice din punct de vedere antigenic cu cele din colostru şi lapte. De asemenea, proporţiile componentelor imunoglobulinice sînt similare în colostru şi în serul animalelor în primele zile de viaţă.

Timp de cel puţin 3—4 săptămîni după naştere viţelul nu sintetizează imunoglobuline proprii în cantităţi semnificative (Jones, 1967; Rice şi Carrière, 1969). În schimb imunoglobulinele absorbite din colostru se menţin în circulaţie, scăzînd treptat în concentraţie dar menţinîndu-şi rolul protector, pînă la aproximativ 60—70 zile. Perioada cea mai critică din acest punct de vedere se situează în jurul vîrstei de 3—4 săptămîni, cînd concentraţia Ig primite pasiv este destul de scăzută iar elaborarea Ig proprii se află în stadiul incipient. După Rice şi Carrière (1969) viţeii au la vîrsta de 6 săptămîni spectrul imunoglobulinic similar cu cel de la bovinele adulte.

În urma stimulării antigenice animalele tinere, chiar în perioada neonatală, au capacitatea de a dezvolta un răspuns imunologic specific.

Astfel, la vîrsta de 1—2 săptămîni, la viţeii care nu au supt colostru, vaccinaţi pe cale nazală sau subcutanată (de două ori), Morein (1972) a constatat formarea anticorpilor contra virusului PI-3 şi prezenţa acestora în secreţiile nazale; anticorpii aparţineau în special clasei IgA. În serul sanguin au fost evidenţiaţi anticorpi din clasele IgM şi IgG. Husband şi Lascelles (1975) au demonstrat că biosinteza anticorpilor se realizează la viţeii în vîrstă de 1 zi—4 luni cu condiţia ca acestora să nu li se administreze colostru care conţine anticorpi faţă de antigenul inoculat.

Însemnătatea deosebită a aportului colostral este demonstrată şi în cazul speciei porcine.

Stone şi col. (1974) constată că protecţia purceilor nou-născuţi faţă de virusul gastroenteritei transmisibile depinde în cea mai mare măsură de primirea colostrului matern bogat în anticorpi specifici. Principalele Ig porcine (IgG, IgM, IgA) sînt purtătoare ale activităţii de anticorpi faţă de virusul TGE. Stone şi col. (1975) constată că sucul gastric, tripsina şi pepsina determină modificări ale proprietăţilor IgA şi IgG dar fragmentele imunoglobulinice care rezultă păstrează, parţial, capacitatea de a neutraliza virusul. Aceiaşi autori (1977) au izolat imunoglobinele IgG, IgM şi IgA din colostrul scroafelor imunizate contra gastroenteritei transmisibile, stabilind că toate au un rol în protecţia purceilor nou-născuţi faţă de virusul TGE. Imunoglobulinele G, A şi M din sîngele cordonului ombilical la purcel au fost dozate de Iabikei şi Namioka (1976), constatîndu-se prezenţa lor la 25%, 5% şi respectiv 45% din probele examinate. Imunoglobulinele cu activitate specifică faţă de parvovirusuri nu au fost transmise transplancentar; autorii consideră că Ig decelate la fetuşii porcini sînt sintetizate de către celule imunocompetente din ţesutul placentar. Într-un studiu efectuat pe un mare număr de probe, Chaniago şi col. (1978) au stabilit prezenţa IgG şi IgM la aproximativ 2% dintre probele examinate.

După prima săptămînă de viaţă, purceii au capacitatea de a elabora

Scanned with OKEN Scanner

anticorpi contra *Escherichia coli* (Porter şi Allen, 1972); principala Ig implicată în apărarea intestinală a purceilor faţă de infecţia colibacilară este IgA (Porter, 1969, Porter şi Allen, 1972; Porter şi col., 1970, 1972; Miller şi col., 1975).

Infecţia purceilor în vîrstă de 4—6 luni a fost urmată de formarea locală în intestin a anticorpilor specifici, predominant din clasa IgA (Sprino şi col., 1976).

Prezenţa imunoglobulinelor în tractusul intestinal reprezintă o condiţie esenţială a rezistenţei animalelor tinere faţă de cei mai diverşi agenţi bacterieni şi virali. După primirea colostrului maternal, vieţii, purceii, mieii şi mîjnii au asigurată apărarea locală conferită de Ig care intră în componenţa colostrului şi, în acelaşi timp, posibilitatea realizării unei protecţii sistemice, prin absorbţia Ig.

Datele cu privire la concentraţiile diferitelor imunoglobuline în secreţiile intestinale la viţei sînt contradictorii; după Gripps şi col. (1974), predomină IgA; Porter şi col. (1972) constată că Ig majoritară este IgM, Mach şi Pahud (1971), Curtain şi col. (1971) decelează imunoglobulina G_1 în proporţie superioară faţă de IgG_2. Efectuînd cercetări la viţei în vîrstă de 2—14 săptămîni, Newly şi Bourne (1976) atestă că principala imunoglobulină din intestinul subţire este IgG_1; celulele formatoare de IgG au fost în număr mai mare faţă de cele care sintetizează IgA. Folosind metode radiobiologice, autorii confirmă că o parte din IgG_1 din intestin provine din ser, prin traversarea celulelor epiteliale şi consideră că la acest nivel are loc un transfer selectiv în favoarea subclasei IgG_1.

Allen şi Porter (1975) au constatat prezenţa imunocitelor care sintetizează IgA şi IgM în *lamina propria* a intestinului la viţei în vîrstă de 4 zile; la aceleaşi animale, sinteza IgG_2 şi mai ales a IgG_1 este comparativ redusă. Populaţiile de celule imunocompetente pot fi activate prin antigene de bacterii Gram negative, rezultînd o producţie de anticorpi specifici.

Micuşan şi col. (1976) au efectuat determinări cantitative ale IgG_1 şi IgG_2 la iezi nou-născuţi, constatînd că IgG_1 este prima sintetizată. La iezii hrăniţi cu colostru a fost observată o capacitate intensificată de răspuns imun faţă de proteine solubile.

În unele situaţii, în serul viţeilor în primele două săptămîni de viaţă concentraţiile imunoglobulinelor sînt foarte scăzute, înregistrîndu-se şi cazuri de agammaglobulinemie (Jones, 1967; Klaus şi col. 1968 şi alţii).

Cauzele acestui deficit imunologic sînt mai multe (uneori pot fi întîlnite concomitent):

— nivelul scăzut al imunoglobulinelor în colostrul şi laptele matern;

— absorbţia deficitară a imunoglobulinelor, datorată administrării tardive a colostrului sau unor leziuni la nivelul mucoasei intestinale;

— degradarea enzimatică precoce a imunoglobulinelor (Pierce, 1967);

— existenţa histaminei (Zarkower, 1967) sau a altor mediatori chimici care inhibă absorbţia din colostru şi lapte.

Gay şi col. (1965) constată niveluri mai scăzute ale Ig serice la viţei în sezonul de primăvară. Smith şi col. (1969) evidenţiază că hipogammaglobulinemia este mai frecventă la viţeii care au primit colostru prin alăptare artificială, în comparaţie cu cei care au supt. Efectuînd determinări cantitative la vieţii care au supt colostru, în vîrstă de 24—36 ore, Logan şi Gibson (1975) observă valori normale IgG şi IgM la aproximativ 50% dintre animale şi hipergammaglobulinemie la 25%; un sfert dintre viţei prezentau valori sub parametrii normali, în cea mai mare parte datorită afecţiunilor mamare ale vacilor.

Viţeii privaţi de colostru sau la care procesul de absorbţie a imunoglobulinelor nu s-a realizat în mod

Scanned with OKEN Scanner

normal sînt deosebit de susceptibili la îmbolnăviri (Gay şi col., 1965; Mayr, 1966; Baier şi col., 1967). La astfel de animale pot evolua stări patologice microbiene produse de germeni cu patogenitate redusă care nu prezintă un pericol serios pentru animalele la care acest factor esenţial de apărare este prezent. Receptivitatea la infecţia colibacilară este marcată la viţeii hipo- sau agammaglobulinemici (Fey şi Margadaut, 1961; Gay şi col., 1965).

Popescu şi col. (1971) au preparat concentrate globulinice din seruri anticolibacilare şi seruri normale de bovine, constatînd valoarea preventivă a acestor biopreparate pentru viţei. Aceiaşi autori (1970) au stabilit că preparatele gammaglobulinice stock sînt preferabile din punct de vedere economic, dat fiind costul lor redus faţă de gammaglobulinele specifice anticolibacilare.

Drăghici (1978) subliniază valoarea profilactică a imunoglobulinelor colostrale şi recomandă cele mai judicioase măsuri pentru aplicarea acestora.

În cadrul a numeroase lucrări a fost stabilită existenţa unei corelaţii între transferul normal al imunoglobulinelor prin colostrul matern şi rezistenţa la infecţii în perioada neonatală (Gay, 1965; Smith şi col., 1967 şi alţii). Hurvell şi Fey (1970) constată că la viţeii în vîrstă de 10—21 zile cu hipogammaglobulinemie incidenţa mortalităţii este mai mare în comparaţie cu cei cu un nivel normal al imunoglobulinelor. De asemenea, hipogammaglobulinemia este însoţită de o greutate redusă a viţeilor. Autorii nu au constatat existenţa unei dependenţe a morbidităţii (inclusiv prin enterite) de nivelul sanguin al imunoglobulinelor. În schimb, Barber (1978) constată că nu există corelaţii între concentraţia IgG şi IgM, pe de o parte, rata mortalităţii şi sporul în greutate pe de altă parte.

La mieii privaţi de colostru a fost constatată o sensibilitate evidentă faţă de infecţia cu *Erysipelothrix rhusiopathiae*, în contrast cu animalele care au primit colostru îndeosebi cu cele care au fost imunizate cu ser antirujetic (Piercy, 1974).

Bem şi Popescu (1973) au aplicat concentrate gammaglobulinice totale în prevenirea pierderilor în perioada neonatală la purcei. Produsul, conţinînd IgG_1 şi IgG_2, IgA şi IgM, a redus pierderile cu peste 13% şi a determinat vindecarea purceilor cu simptome de enterită. Autorii au demonstrat absorbţia intestinală a imunoglobulinelor în primele 6 ore de la naştere.

Targovski (1975) constată că la caii cu afecţiuni enterice concentraţia IgA serice este semnificativ scăzută în comparaţie cu caii normali, în timp ce concentraţia IgG este crescută. În perioada manifestărilor clinice severe este evidenţiată şi o scădere a capacităţii reactive a limfocitelor faţă de mitogeni.

V. 5.4. Imunoglobulinele la animalele domestice

La bovine, în cadrul clasei IgG sînt descrise două subclase, respectiv IgG_1 şi IgG_2. Dintre acestea, IgG_1 este regăsită, în calitate de componentă principală, în secreţiile lactate (Murphy şi col. 1964; Micuşan şi Buzilă, 1965; Pierce şi Feinstein, 1965; Rice şi Carrière, 1969; Duncan şi col., 1972) şi în salivă. IgG_2 se găseşte în serul sanguin, fiind imunoglobulina serică majoritară (Klaus şi col., 1969), dar este decelată, în cantităţi reduse şi în lapte, colostru şi salivă. Concentraţiile IgG_1 şi IgG_2 sînt 9 şi respectiv 10 g/1 l în serul sanguin, 4 g/1 l în

Scanned with OKEN Scanner

salivă, 34 şi respectiv 4,9 mg/ml în lapte. Proprietăţile fizico-chimice ale subclaselor de imunoglobuline G bovine sînt similare celor de la alte specii, fapt demonstrat şi prin evidenţierea determinanţilor antigenici comuni ai lanţurilor grele la bovine şi alte specii — în primul rînd ovine şi caprine; cu toate acestea, IgG bovine se disting printr-o accentuată heterogenitate.

Coeficientul de sedimentare este situat sub valoarea 7 S, fiind mai redus la subclasa IgG_1. Greutăţile moleculare ale celor două subclase de IgG sînt 163 000, respectiv 150 000. Conţin hidraţi de carbon în proporţie de 2—4%. Cele două subclase pot fi izolate şi/sau diferenţiate prin cromatografie pe schimbători de ioni, imunoelectroforeză, imunodifuziune, electroforeză, fracţionare cu alcool etilic (printre alţii, Buttler, 1970; Klaus şi col., 1969). Fang şi Mukkur (1976) au izolat fragmente IgG colostrale bovine obţinute prin digestie cu pepsină, tripsină şi papaină, stabilind greutăţile lor moleculare.

Mobilitatea electroforetică situează IgG_1 în zona β şi γ rapidă, iar IgG_2 în zona γ (Pierce şi Feinstein, 1965; Duncan şi col., 1972).

Între cele două subclase există diferenţe ale structurilor primare (Milstein şi Feinstein, 1968) şi din punct de vedere antigenic (Pierce şi Feinstein, 1965; Butler, 1970; Corbeil şi col., 1974; Allen şi Porter, 1975; Duncan şi col., 1975; Kemler şi col., 1975 etc.); fragmentele Fab sînt similare (Murphy şi col., 1965) în timp ce fragmentul Fc este cel care prezintă diferenţe de structură antigenică la cele două subclase (Semeleva şi Kulberg, 1968).

Este emisă ipoteza cu privire la prezenţa celei de a treia subclase de IgG, pe baza aspectelor imunoelectroforetice şi a separării pe coloane de DEAE-Sephadex.

Imunoglobulinele bovine nu se transmit prin placentă; în schimb sînt transmise prin colostru şi lapte, îndeosebi subclasa IgG_1. Ambele subclase au activitate precipitantă; IgG_1 are proprietatea de a fixa complementul şi face parte dintre anticorpii citofili, participînd astfel la unele procese imunologice mediate celular. Receptorii imunoglobulinici se găsesc în fragmentul Fc (Rhodes, 1975). În cazul macrofagelor bovine a fost demonstrată prezenţa receptorilor pentru ambele sublcase de IgG (Rossi şi Kiesel, 1977).

Imunoglobulinele G de la porcine au structură şi proprietăţi asemănătoare celor de la alte specii. Au fost evidenţiate două subclase, IgG_1 şi IgG_2 (Perry, 1976). Vior şi col. (1975) pun în evidenţă prezenţa imunoglobulinelor G_1 şi G_2 în serurile provenite de la scroafe şi de la purceii acestora; la 5—6% dintre probele de ser examinate prin imunoelectroforeză a fost decelată o imunoglobulină de tip G cu migrare lentă, situată în zona beta-gamma. Prin metoda electroforezei în gel de poliacrilamidă Ţeţu (1978) a pus în evidenţă heterogenitatea imunoglobulinelor la porc, relief ind existenţa unor modificări în stări patologice precum şi absenţa Ig la purceii nou-născuţi.

La porc imunoglobulinele serice şi colostrale majoritare sînt cele care aparţin clasei IgG (25 mg/ml, respectiv 62 mg/ml).

Imunoglobulinele G de oaie şi capră posedă determinanţi antigenici şi proprietăţi similare cu cele descrise la om (Aalund şi col., 1965; Heiner şi col., 1969). A fost demonstrată de numeroşi autori, heterogenitatea acestor proteine (Pan şi col. 1968; Feinstein şi Hobart, 1969 şi alţii). Curtain (1969) a descris o a treia subclasă de IgG la oaie, deşi majoritatea autorilor admit numai existenţa subclaselor IgG_1 şi IgG_2. Autorul a notat această proteină IgG_1A şi i-a atribuit activitate de reagină, notînd şi prezenţa a numeroase celule care o produc în intestinul oilor parazitate.

Scanned with OKEN Scanner

Cercetînd unele caractere ale imunoglobulinelor ovine Ciupercescu (1977) constată că IgG poate atinge valori de pînă la 50 mg/ml în serul sanguin.

Ciupercescu (1979) a identificat, izolat şi cuantificat imunoglobulinele IgG_1, IgG_2, IgM şi IgA de oaie (aceasta din urmă fără a fi determinată şi cantitativ). Clasele şi subclasele de Ig au fost identificate prin imunoelectroforeză iar concentraţiile au fost determinate prin testul Mancini.

După Feinstein şi Hobart (1969) IgG_1 şi IgG_2 izolate de la oaie sînt identice din punct de vedere antigenic cu imunoglobulinele respective de la bovine.

Bienenstock şi col. (1973) au studiat distribuţia celulelor formatoare de imunoglobuline G în ţesuturile de pui de găină constatînd prezenţa lor în cecum, splină, bursă şi glandele Harder. Imunoglobulina G de găină are coeficientul de sedimentare 6,9—7,2 S şi greutatea moleculară de 150 000—206 000; conţine 2—3% glucide.

Imunoglobulina M include mai puţin de 10% din totalul imunoglobulinelor bovine (Klaus şi col., 1969). Prezintă proprietăţi fizico-chimice şi biologice similare cu IgM de la alte specii (Murphy şi col., 1965, 1966; Erler şi Schimmel, 1967, Klaus şi Jones, 1968). Are un coeficient de sedimentare de 19 S şi greutatea moleculară 900 000. După Buttler (1971), IgM bovină există în ser şi sub forma 7 S. Mukkur (1971) a constatat că, în general IgM are dimensiuni moleculare superioare faţă de aceeaşi proteină umană. Conţine hidraţi de carbon în proporţie de 12,3%. Concentraţia IgM în ser şi colostru se situează în jurul valorii de 3 mg/ml.

Răspunsul imun primar la bovine implică în mod aproape exclusiv formarea imunoglobulinelor M specifice, aceasta fiind principala clasă cu proprietăţi aglutinante, fapt demonstrat în cazurile de infecţii cu *Brucella*, *Anaplasma* şi altele. Hanson (1970) demonstrează că în infecţia leptospirică a bovinelor prima imunoglobulină decelabilă este IgM, imediat după terminarea episodului de bacteriemie.

Între lanţurile grele ale IgM umane şi bovine există unele similitudini de structură antigenică. Imunoglobulina nu se transmite prin placentă dar este prezentă în colostru şi lapte. Mukkur (1972) a izolat IgM din colostrul bovin, determinînd valenţa şi constanta de asociere intrinsecă medie a anticorpilor asociaţi cu această Ig.

La porc, IgM are caractere similare celor de la om. Astfel, constanta de sedimentare este 18—19 S şi este constituită din polimeri pentamerici în cadrul cărora este prezent lanţul de legătură J (Perry, 1976). În cadrul răspunsului imunologic este prima Ig sintetizată.

Formarea imunoglobulinei M a fost observată la nivelul plasmocitelor din lamina propria a intestinului de porc. Celule producătoare de IgA şi IgG au fost puse în evidenţă de asemenea în acelaşi ţesut (Brown şi Bourne, 1976).

Person (1978) a descris imunoglobulina M de cîine, constatînd că aceasta este prima sintetizată ca răspuns faţă de inocularea unui antigen. Autorul nu semnalează diferenţe notabile faţă de IgM de la alte specii (element valabil şi pentru clasele IgG şi IgA).

Mitchell şi col. (1977) au izolat IgM de cal; în continuare, ei au purificat lanţul J din această proteină.

Thompson şi Reynold (1977) au izolat din colostru şi din secreţiile bronhice şi au caracterizat imunoglobulina M de cîine. Aceasta include în componenţa sa o glicoproteină, care o diferenţiază de IgM serică şi care este considerată ca o componentă secretorie legată covalent.

La păsări, a fost de asemenea descrisă o imunoglobulină din clasa M. Astfel, Goudswaard şi col. (1977) au constatat prezenţa acesteia în ser şi în

Scanned with OKEN Scanner

albuşul de ou la curcă. După Feinstein şi Munn (1969), IgM de pasăre este formată din molecule 17—18 S şi 27—28 S, are greutatea moleculară de aproximativ 890 000 şi o structură pentamerică; are un conţinut în hidraţi de carbon de 6,6%. Mehta şi col. (1972) au demonstrat existenţa unei înrudiri antigenice între IgM aviară şi cea de mamifer.

Imunoglobulina A bovină a fost descrisă de numeroşi autori, printre care Murphy şi col. (1964), Groves şi Gordon (1967), Rice şi Carrière (1969), Buttler (1970). Ulterior, Porter şi Noakes (1970) au identificat IgA bovină în ser şi colostru, precum şi componenta secretorie liberă în secreţiile intestinale. Are un coeficient de sedimentare şi o greutate moleculară variabilă, în funcţie de formă (monomer, dimer etc.). Are un conţinut în hidraţi de carbon de 8—9%.

La cîine, IgA a fost determinată cantitativ în ser, colostru, lapte, secreţii salivare şi intestinale. În secreţii, cu excepţia colostrului, IgA este predominantă faţă de IgM şi IgG.

Imunoglobulina A de secreţie (SIgA) nu a fost pusă în evidenţă la bovine de către unii cercetători (Sullivan şi col., 1969). Această proteină a fost descrisă de Mach şi col. (1969) care a decelat-o în colostru. În cîmpul electroforetic migrează în zona gamma. Are coeficientul de sedimentare 11 S şi un conţinut ridicat în hexoze.

Concentraţia sa în colostru este relativ scăzută (în contrast cu ceea ce este constatat la om), proteina majoritară fiind IgG_1. În schimb, SIgA este dominantă în alte secreţii ca saliva, lichidul spermatic, lacrimi, secreţii nazale şi intestinale. Componenta secretorie liberă a fost decelată în proporţii ridicate în lapte (Mach şi Pahud, 1971).

În serul sanguin, Mach şi Pahud (1971) au pus în evidenţă două forme de IgA: forma serică obişnuită şi SIgA, în cantităţi reduse.

Sinteza SIgA a fost realizată *in vitro* în culturi celulare de glande salivare, cu încorporarea aminoacizilor marcaţi.

Din punct de vedere antigenic, SIgA este similară cu SIgA umană, constatare făcută prin reacţia încrucişată între serul anti-SIgA umană şi IgA bovină (identitate parţială în testul de imunodifuziune în gel de agar). Mach (1971) a reuşit să combine *in vitro*, componenta secretorie bovină cu IgA izolată de la 8 specii de mamifere, confirmînd o posibilitate stabilită anterior în cazul componentei secretorii umane.

După Mach şi Pahud (1971) SIgA este sintetizată în special în glandele salivare, mai puţin în ganglionii limfatici şi glanda mamară. Autorii trag concluzia după care la bovine există o diferenţă clară între organele de secreţie normale (glande salivare şi lacrimale, mucoasele respiratorie şi intestinală) şi glanda mamară, aceasta din urmă avînd un rol cu totul secundar în sinteza de SIgA. În acelaşi timp, este remarcabil conţinutul ridicat al colostrului în componenta secretorie liberă (8 mg/100 ml în medie). Cantitatea mare de salivă produsă de bovine precum şi concentraţia ridicată de IgA în aceasta (40—70 mg/100 ml) demonstrează că bovinele secretă imunoglobulina A în proporţii relativ mari.

Perry (1976) comunică prezenţa imunoglobulinei A la porc sub formă de monomeri 7 S şi dimeri 9,5—10 S. În secreţii, imunoglobulina A se prezintă sub forma dimerică 11 S, include o componentă secretorie şi este deosebit de rezistentă la acţiunea enzimelor. Este componenta imunoglobulinică majoritară în lactoser. Ca şi la alte specii, IgA de secreţie este sintetizată la nivelul sistemului imunocompetent local (mucoasele respiratorii, digestivă, cele din aparatul genital şi din glanda mamară) (Charley, 1976). În secreţiile traheo-bronhice ale porcului, 61% dintre Ig aparţin clasei IgA, fiind însă prezente şi imunoglobulinele M şi G (Holmgren, 1973).

Scanned with OKEN Scanner

În testul de imunodifuziune s-a constatat o fuziune completă între SIgA din ser şi componenta secretorie liberă, datorită precipitării anticorpilor contra lanţului alfa. O completă fuziune între cele două antigene este obţinută şi cu antiserul contra componentei secretorii libere (Pahud şi Mach, 1970). Aceiaşi autori au demonstrat existenţa unor similitudini de structură antigenică între imunoglobulina A de oaie şi cele izolate de la bovine şi caprine.

La găină, a fost evidenţiată o imunoglobulină omoloagă cu IgA de la mamifere, net distinctă faţă de IgG şi IgM, prezentă în bilă, salivă, lichidul lacrimal, conţinutul oviductului şi al intestinului (Lebacq-Verheiden şi col., 1972; Orlans şi Rose, 1972; Bienenstock şi col., 1972; Leslie şi Martin, 1973). A fost descrisă şi o moleculă proteică în imunoglobulina A de găină, echivalentă cu componenta secretorie de la mamifere (Rose şi col., 1974; Watanabe şi Kobayashi, 1974; Watanabe şi col., 1975; Porter şi Parry, 1976), precum şi existenţa lanţului J în cadrul structurii acestei molecule complexe (Kobayashi şi col., 1973). În bilă, mucusul traheobronhic şi albuşul de ou a fost decelată componenta secretorie liberă (Bienenstock şi col., 1972; Katz şi col., 1974; Rose şi col., 1974). La găină, răspunsul imunologic faţă de *E. coli* (germeni vii sau inactivaţi) se caracterizează prin creşterea numărului de celule producătoare de IgA şi IgM în intestinul subţire şi prin prezenţa acestor două Ig în conţinutul intestinal (Parry şi col., 1977).

Porter şi Parry (1976) au efectuat cercetări pentru caracterizarea IgA de găină, izolată din bilă, intestin şi ser sanguin. Autorii au semnalat existenţa a două clase moleculare de IgA, 7 S şi respectiv 15 S, între care există o identitate antigenică parţială.

Imunoglobulina A a fost descrisă şi la alte specii de păsări (Parry şi Aitken, 1975), pe baza reactivităţii încrucişate cu IgA de găină. S-a demonstrat, de asemenea, că IgA din tractusul respirator este purtătoarea activităţii specifice contra virusului bolii de Newcastle (Parry şi Aitken, 1973).

Goudsward şi col. (1977) au descris IgA la curcă, stabilind că aceasta este prezentă în albuşul de ou, secreţiile intestinale şi bilă. IgA de curcă a fost izolată de Dohms şi col. (1978) din bilă şi din conţinutul intestinal şi evidenţiată în ser, salivă, secreţii lacrimale, secreţii traheale; autorii descriu două tipuri de molecule IgA cu greutăţi moleculare diferite.

Aitken şi Parry (1976) stabilesc că la găină are loc o trecere a anticorpilor contra eritrocitelor de oaie şi contra albuminei serice bovine din serul sanguin în lacrimi şi salivă. În acelaşi timp, la nivelul tractusului respirator se produce sinteza anticorpilor faţă de infecţii virale.

Matthaeus şi Korn (1966) semnalează prezenţa imunoglobulinei D la porc anunţînd că aceasta are proprietăţile semnalate anterior în cazul IgD umane (Rowe şi Fahey, 1965).

Matthaeus şi col. (1970) au studiat spectrul imunoglobulinelor porcine în urma infecţiei cu virusul pestei porcine clasice. Pe lîngă cele trei imunoglobuline evidenţiate anterior, autorii au decelat prezenţa imunoglobulinei D, pe baza proprietăţilor fizicochimice; această proteină este eluată, prin gelfiltrare, între IgM şi IgG iar prin cromatografie pe DEAE-Sephadex A 50 de către tampoanele NaCl, 17 mol.

După Curtain (1975), citat de Ciupercescu), IgD pare să fie prezentă şi la oaie.

O serie de date din literatură atestă prezenţa *imunoglobulinelor E* reaginice la animale. Aceasta rezultă din semnalarea stărilor de hipersensibilizare mediate prin anticorpi la unele animale domestice, fără ca în cazurile respective

Scanned with OKEN Scanner

să se evidenţieze clase de imunoglobuline participante.

Metzger (1976) realizează, în condiţii experimentale, sindromul de anafilaxie la porc; reproducerea sensibilizării a fost confirmată prin testul de anafilaxie cutanată pasivă. Reaginele implicate în acest fenomen au fost analizate luîndu-se în considerare proprietăţile fizico-chimice, cinetica apariţiei în ser, termosensibilitatea şi rezistenţa faţă de cromoglicatul de sodiu. Autorul constată că imunoglobulinele puse în evidenţă au greutatea moleculară 170 000, sînt eluate din coloana cu Bio-Gel A împreună cu IgG, sînt inactivate prin încălzire 2 ore la 56°C; biosinteza acestor imunoglobuline este iniţiată îndeosebi prin inocularea antigenului cu adjuvant, pe căile intradermică şi intramusculară.

În urma imunizării bovinelor cu doze mici de dinitrofenil-edestină, Mossmann şi col. (1978) au evidenţiat formarea anticorpilor anafilactici din clasa IgE. În urma sensibilizării bovinelor cu proteine plasmatice sau cu complexe proteină-haptenă este indusă biosinteza IgE care este transmisă prin colostru şi ulterior absorbită intactă din intestinul viţeilor în serul sanguin al acestora (Hammer şi col., 1971; Mossmann şi col., 1974). O imunoglobulină similară IgE de la om a fost descrisă la bovine de Schultz şi col. (1971), Nielsen şi col. (1976), Nielsen şi Wilkie (1977) precum şi la ovine (Curtain, 1969; Hogarth-Scott, 1969).

Perrudet-Badoux şi col. (1976) au pus în evidenţă formarea IgE la şobolanii infestaţi cu *Trichinella spiralis*, fapt care atrage atenţia asupra unor noi căi de studiu al patogenezei acestei infestaţii. Imunoglobulina E a fost descrisă la cîine de Hallswell (1975); autorul a decelat celulele care realizează sinteza IgE la piele, splină, intestin, ganglionii limfatici, folosind testul de imunofluorescenţă. În ser, concentraţia sa a fost de 30—420 μg/ml. Mărirea concentraţiei a fost corelată cu infestaţia cu *Toxocara canis*.

Hallswell şi col. (1975) semnalează existenţa unor asemănări strînse între IgE umană şi cea canină, evidenţiate prin cromatografie, rezistenţa la congelări — decongelări repetate, modificări de pH, încălzire etc.

Scanned with OKEN Scanner

VI Efectorii celulari ai imunității

Imunitatea dobîndită și stările de hipersensibilitate sau alergie se pot realiza prin efectori umorali sau celulari.

Împărțirea stărilor de imunitate dobîndită în imunitate de tip umoral și de tip celular se bazează pe predominența uneia sau a celeilalte din cele 2 categorii de efectori. În cazul majorității stărilor de imunitate, cele 2 feluri de efectori coexistă și cooperează.

Efectorii umorali reprezentați de imunoglobuline sau anticorpi au fost pe larg descriși în capitolul anterior. Efectorii celulari au fost în parte amintiți la capitolul privind mecanismele imunogenezei.

Imunitatea celulară este deseori tratată în lucrările de specialitate laolaltă cu bazele și mecanismele celulare ale răspunsului imun.

În lucrarea de față, se face o distincție netă între procesele celulare implicate în cinetica răspunsului imun și imunitatea celulară propriu-zisă care este privită prin analogie cu cea umorală ca etapă finală și consecință a răspunsului imun, materializată prin prezența în organism a unor efectori față de antigenul declanșator al răspunsului imun, reprezentați de celule imunocompetente pe suprafața cărora s-au format sedii de cuplare pentru antigen cu un grad de specificitate la fel de înalt ca al situsurilor combinative al anticorpilor. Aceste celule reprezintă la nivel de organizare celular echivalentul anticorpilor la nivel molecular.

Stările de imunitate de tip celular se caracterizează prin următoarele particularități:

— în cazul a numeroase antigene microbiene se observă o corelație între parazitismul intracelular al germenilor și predominența efectorilor imuni celulari (de ex.: *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella*, *Salmonella* etc.);

— între imunitatea dobîndită de tip celular și hipersensibilitatea (alergia) întîrziată, stări al căror determinism imunologic celular este identic, există o linie de demarcare mai puțin precisă ca între imunitatea dobîndită umorală și alergiile de tip imediat. În cazul stărilor de imunitate celulară și alergie întîrziată, trecerea dintr-una în cealaltă este mai mult condiționată de un prag cantitativ al intensității fenomenelor, decît de un anumit tip de efectori;

— acțiunea efectorilor asupra antigenului specific se realizează frecvent în cooperare cu factori nespecifici (macrofage, diferite alte categorii de celule), unii dintre ei avînd o pondere egală în mecanismele umorale, cît și în cele celulare ale imunității cum este cazul complementului.

Scanned with OKEN Scanner

Cele mai importante categorii de celule care îndeplinesc rolul de efectori imuni sînt limfocitele T — efectorii şi diferite tipuri de macrofage.

Limfocitul T specific sensibilizat este desemnat şi sub denumirile de efector, reactiv, stimulat, citotoxic, killer (ucigaş). Intervenţia sa este evidentă îndeosebi în mecanismele imunităţii celulare, a reacţiei de rejet a grefelor şi în alte forme ale alergiei întîrziate de tip IV. Limfocitul T — efector provine dintr-un limfocit T-antigen senzitiv stimulat antigenic direct sau mediat de un limfocit T-helper printr-un mecanism de cooperare celulară T-T. Celulele T-efectoare aparţin categoriei de limfocite mici şi prezintă unele asemănări cu limfocitele T_1-supresoare cu care au comună prezenţa pe suprafaţa lor a antigenului Ly-2,3. Antigenele către care este îndreptată acţiunea celulelor T-efectoare sînt de regulă celule din diverse ţesuturi pe a căror membrană se găsesc antigenele specifice sediilor de cuplare de pe suprafaţa limfocitelor T-efectoare. Aceste celule sînt sugestiv denumite „celule ţintă", întrucît limfocitele sînt atrase spre ele şi le omoară prin ciocnire mecanică şi efect toxic. Antigenele care îmbracă celulele ţintă sînt de regulă antigenele de histocompatibilitate, ajunse într-un context imunologic histoincompatibil. Cele mai frecvente celule ţintă sînt celulele constituente ale grefelor şi tumorilor. Efectul ucigaş (killer) al limfocitelor T-efectoare este specific şi direct, fără intervenţia nici unui alt factor mediator. Această precizare este utilă datorită faptului că şi în alte procese şi reacţii imunologice diverse celule se pot comporta ca „celule ţintă" (target cells), acţiunea efectorilor imuni singuri sau combinaţi cu factori nespecifici putînd duce la efecte killer, dar prin alte tipuri de mecanisme. Aşa este cazul mastocitului îmbrăcat cu IgE, care se comportă ca o celulă ţintă faţă de antigenul alergizant care-i provoacă moartea, sau al celulelor acoperite cu alţi anticorpi citofili care prin descoperirea regiunilor lor Fc atrag celulele K nespecifice propriu-zise sau natural killer, pe a căror suprafaţă se găsesc receptori Fc.

Nu există o certitudine deplină asupra identităţii limfocitelor T-reactive, care acţionează citotoxic în rejetul grefelor şi al celulelor maligne cu cele care determină alergia întîrziată.

Pentru realizarea efectului citotoxic limfocitul T-efector acţionează pe 2 căi şi anume:

1. prin numărul celulelor, care se aglomerează în jurul antigenului în urma transformării lor blastice şi a unei reacţii proliferative, fenomen uşor decelabil atît *in vivo*, cît şi *in vitro*. În cazul răspunsului primar, reacţia proliferativă se bazează pe recunoaşterea histoincompatibilităţii celulelor alogene. Răspunsul secundar se manifestă prin afluxul celulelor proliferate în jurul antigenului. În afara antigenelor histoincompatibile, proliferarea limfocitelor poate fi determinată şi de diferiţi factori mitogeni nespecifici ca fitohemaglutinina şi concanavalina A care acţionează selectiv asupra limfocitelor T, spre deosebire de streptolizină şi endotoxinele bacteriilor Gram negative, care stimulează şi multiplicarea limfocitelor B;

2. prin mediatori moleculari eliberaţi de limfocite; aceştia acţionează asupra altor categorii de celule potenţîndu-le nespecific diferite activităţi biologice, care au ca efect îndepărtarea sau distrugerea „non selfului". Aceşti mediatori sînt desemnaţi sub numele generic de „limfokine". Ele acţionează prin mecanisme variate, dintre care cele mai bine studiate pînă în prezent sînt următoarele:

a) activarea macrofagelor, printr-un factor activator care determină creşterea potenţialului de fagocitoză şi pinocitoză al acestora;

b) inhibarea migrării diferitor celule, mai ales a macrofagelor prin MIF (Macrophage Inhibiting Factor) şi eventual şi a altor leucocite. Astfel, Goetze şi Rocklin (1978) au

Scanned with OKEN Scanner

obţinut din limfocitele periferice umane stimulate cu concanavalină A, un factor inhibitor pentru migrarea polimorfonuclearelor (LIF = Leucocite Inhibiting Factor).

Cohen şi col. (1978) identifică factori inhibitori ai migrării celulelor tumorale (TMIF);

c) determinarea de leziuni grave a celulelor ţinută care duc la moartea acestora prin factorii limfocitotoxici;

d) stimularea multiplicării diferitelor celule prin factori mitogeni care ţin de limfokine; aceştia sînt capabili să determine proliferarea atît a limfocitelor alogenice, cît şi a celor singenice; ele reprezintă un factor de dirijare prin limfocitele T-efectorii a nevoilor cantitative, de amplificare, în anumite faze, a reacţiei imune.

Macrofagul este cea de a doua celulă implicată în numeroase mecanisme ale imunităţii celulare. Gradul de specificitate al acţiunii lui este însă foarte variat. Uneori, este greu de făcut o delimitare între intervenţia macrofagului ca factor al imunităţii naturale şi calităţile de factor specific pe care le poate dobîndi prin diferite mecanisme. În ordine descrescîndă a specificităţii de reacţie cu antigenul pot fi deosebite următoarele tipuri de macrofage:

1. macrofagul armat, care ia naştere prin ataşare pe suprafaţa celulei a factorului de armare (SMAF = specific macrophage arming factor) identificabil cu receptorul pentru antigen transferat de pe limfocitul T pe macrofag;

2. macrofagul activat prin diferiţi factori solubili. Cohen şi col. (1978) opiniază că termenul de macrofag activat are o semnificaţie semantică prea vagă şi că el nu trebuie folosit decît cu precizarea factorului activator. Factorii activatori cei mai eficaci sînt limfokinele elaborate de celulele T-efectorii.

Principalele mecanisme de acţiune faţă de antigen ale macrofagelor armate şi activate sînt următoarele:

a) creşterea aderenţei de antigen (imunoaderenţă), fenomen care favorizează la rîndul lui fago- şi pinocitoza;

b) inhibarea multiplicării intrafagocitare a unor germeni care în mod obişnuit sînt insensibili la enzimele lizozomale ale fagocitelor, rămîn viabili în citoplasmă fiind chiar capabili să se multiplice. În macrofagul activat, nu mai are loc diviziunea acestor celule, ci dimpotrivă, printr-o transformare şi amplificare a activităţii enzimelor, macrofagul dobîndeşte capacitatea de a le digera; în acest grad de activare se numeşte şi macrofag furios (angry macrophage);

c) creşterea potenţialului de multiplicare care la rîndul lui determină o amplificare a proceselor de fagocitoză a non selfului;

d) elaborarea unor factori endogeni pirogeni eliberabili în mediul extracelular, corelată cu intensitatea activităţilor lizozomale din celulă, care contribuie la procesul inflamator, ce însoţeşte de obicei reacţia imună.

În mecanismele imunităţii celulare participă prin urmare ambele categorii de celule implicate în majoritatea proceselor imunologice — limfocitele şi macrofagele. Activitatea limfocitelor T-efectorii are, în general, un grad de specificitate mai ridicat, iar intervenţia lor este, de regulă, declanşantă pentru celelalte reacţii imune. Contribuţia macrofagelor poate avea variate grade de specificitate, iar activarea lor este în cele mai multe cazuri secundară fiind determinată de limfokinele elaborate de celulele T-efectorii. Se constată totodată o predominenţă a intervenţiei primei sau a celei de a doua categorii de factori imuni în funcţie de starea imunologică. Astfel, în reacţia antigrefă şi în fenomenele de autoagresiune rolul preponderent revine limfocitelor T-reactive, în timp ce în numeroase forme de imunitate celulară antimicrobiană este mai accentuată intervenţia macrofagelor.

Scanned with OKEN Scanner

Principala modificare suferită de non self sub acţiunea reacţiilor de imunitate celulară constă în formarea unui factor inflamator limitrof non selfului format din celule care se găsesc în mod obişnuit în organism (macrofage, limfocite, polimorfonucleare etc.), după cum şi din celule de neoformaţie (celule epitelioide, gigante etc.) induse de efectorii imuni celulari, mai ales sub acţiunea limfokinelor. Categoria de celule care predomină în focarul inflamator este deseori caracteristică pentru anumite antigene mai ales microbiene, reprezentînd un argument morfopatologic important în stabilirea diagnosticului unor bacterioze, viroze şi parazitoze. Inflamaţia constituită în jurul non selfului, la care, aşa cum s-a arătat iau parte atît factorii celulari ai imunităţii dobîndite, cît şi cei ai imunităţii naturale activaţi sub acţiunea celor dintîi poate avea următoarele consecinţe:

— eliminarea non selfului, în urma fenomenelor supurative sau necrotice, care-l separă de ţesuturile normale, fenomen întîlnit mai ales în reacţiile antigrefă;

— circumscrierea non selfului prin constituirea unei leziuni de tip granulomatos, în centrul căreia se găseşte non selful devenit inofensiv pentru organism în cazul cînd acesta este un agent animat. Anihilarea potenţialului nociv al non selfului se poate realiza sub mai multe variante — sechestrare, omorîre, necroză, liză etc. Ţesutul de neoformaţie din jur diferă de asemenea după natura agentului. Cu timpul, ţesutul de granulaţie se fibrozează constituind capsule de diferite grosimi, iar centrul poate şi el suferi fenomene de tipul cazeificării, fibrozării, calcificării etc. În acest fel, non selful, deşi prezent în organism, este complet separat de ţesuturile normale, asupra cărora nu mai are nici un efect nociv cu excepţia compresiunii mecanice. Amplificarea granuloamelor duce la constituirea de leziuni nodulare macroscopice. Această formă de evoluţie a reacţiei celulare este caracteristică mai ales în infecţiile microbiene pentru care este caracteristică imunitatea de tip celular, acompaniată de hipersensibilitate întîrziată, cum este cazul tuberculozei, brucelozei etc., după cum şi în unele parazitoze;

— alterarea şi degradarea treptată consecutiv unor fenomene inflamatorii de intensitate mai redusă şi de degenerare a unor ţesuturi sub acţiunea îndelungată a efectorilor imuni. Acest tip evolutiv este caracteristic mai ales fenomenelor de autoagresiune.

Rezumînd diferitele variante în care evoluează şi se termină reacţiile celulare imune, ele se caracterizează toate prin tendinţa permanentă, deseori finalizată, de îngrădire, îndepărtare sau distrugere a non selfului.

Forme de acţiune sinergică a efectorilor umorali şi celulari. În afară de faptul că în determinarea celor mai multe stări de imunitate dobîndită efectorii umorali şi celulari coexistă şi cooperează, au fost evidenţiate mecanisme imune în care ambele categorii de factori interacţionează cu antigenul potenţîndu-se reciproc.

Imunocitoaderenţa macrofagică este unul din fenomenele care se pot realiza printr-un asemenea gen de mecanism. Într-o primă fază, anticorpii citofili reprezentaţi de imunoglobuline de tip γ 2 se fixează cu fracţiunea Fc pe celula macrofagică (Barker şi Benacerraff, 1966). Macrofagul astfel acoperit cu anticorpi va fixa cu uşurinţă pe suprafaţa lui antigenul specific anticorpilor citofili sau va adera de acesta. Fenomenul este caracteristic hipersensibilităţii întîrziate, în care apar anticorpi citofili pentru macrofage.

Efectul citocid prin celulele K constituie un mecanism similar în care intervine un anticorp citofil şi o celulă efectoare. Anticorpul este un element specific în această reacţie, iar celula efectoare activează ca un factor nespecific. Anticorpii aderă prin situsurile

Scanned with OKEN Scanner

lor combinative de antigenele reprezentate de compuşi chimici din membrana celulei ţintă. Celulele K, avînd pe suprafaţa lor receptori Fc, recunosc regiunea corespunzătoare a anticorpilor citofili şi produc efectul citocid asupra celulei ţintă într-o modalitate asemănătoare cu limfocitele T citotoxice. Fenomenul este numit „citotoxicitate mediată celular dependentă de anticorpi" (ADCC = antibody dependent cell mediated cytotoxicity).

Citotoxicitatea datorată atît limfocitelor T cît şi celulelor K implică scăderea conţinutului celulei în cAMP şi creşterea nivelului cGMP (vezi p. 72—73).

Scanned with OKEN Scanner

VII Complementul (Alexina) şi Properdina

VII. 1. Complementul

Primele observaţii referitoare la existenţa acestui complex seric au fost făcute de Buchner în 1891, care atribuie constatarea sa conform căreia sîngele este invadat de bacteriile de putrefacţie mai tîrziu decît alte ţesuturi, prezenţei unui factor bactericid pe care-l numeşte iniţial amboceptor şi mai tîrziu alexină. Bordet, începînd din 1895 şi mai tîrziu Ehrlich (1905), introduc termenul de complement. Studiile aprofundate ale lui Bordet singur şi apoi împreună cu Gengou în perioada 1895—1901 au lămurit în mare parte proprietăţile complementului şi rolul pe care-l îndeplineşte în reacţiile de hemoliză şi bacterioliză imună.

Este de multă vreme cunoscută compoziţia proteică complexă a alexinei şi extrema ei labilitate la acţiunea factorilor de mediu. Inactivarea ei la 56°C a fost stabilită încă de Bordet, care a exploatat în mod ingenios această însuşire în cadrul RFC. Ulterior, au început să fie identificate fracţiunile componente ale complementului, ajungîndu-se astăzi la cunoaşterea a 12 fracţiuni proteice notate cu iniţiala C urmată de o cifră arabă singură, sau urmată de o literă mică din alfabetul latin. Primele 3 fracţiuni sînt notate C_{1q}, C_1 şi C_{1s}; următoarele 8 sînt notate C_2, C_3 ..... C_9, iar ultima C_x. Ulterior, s-a dovedit că cele 4 fracţiuni notate C_2—C_5 în cursul acţiunii lor se scindează fiecare în cîte 2 subfracţiuni desemnate cu literele a şi b imediat după cifra arabă, de exemplu C_{2a} şi C_{2b}, C_{3a} şi C_{3b} etc.

În tabelul VII.1, sînt prezentate componentele complementului şi cîteva din principalele lor însuşiri.

Complementul se găseşte în serul normal al tuturor vertebratelor, inclusiv al peştilor în proporţii care variază în funcţie de specie. În afară de sînge, complementul poate fi prezent în proporţii mai reduse şi în alte umori ca lichidul pleural şi peritoneal.

Complementul este sintetizat de diverse celule şi ţesuturi din organism în cursul dezvoltării embrionare a organismului. Fracţiunile nu au un sediu unic de sinteză, aceasta avînd loc în organe diferite (de ex.: fracţiunea C_3 în ficat).

Alexina apare în umori la scurt timp după naştere: 5—7 săptămîni la şobolan, 3—4 săptămîni la porc (după Stamatin, 1965). Titrul complementului din ser se dublează, de regulă, în cursul primelor 3 luni de la naştere, după care se menţine la un

Scanned with OKEN Scanner

Tabel VII. 1.

Fracţiunile şi subfracţiunile complementului

Fracţiunea	Natura chimică	Masa moleculară	Concentraţia în ser g/ml ser	Activitatea biologică
C_{1q}	euglobuline	400 000	190	proteolitică
C_{1r}		168 000		peptidazică
C_{1s}		79 000	120	serin-esterazică
C_{2a}	pseudoglobulină	117 000	10—30	participă la C_3 convertază
C_{2b}				
C_{3a}	glicoeuglobulină inactivată		500—1300	anafilatoxină I
C_{3b}		185 000		participă la C_5 convertază
C_{4a}	glicoeuglobulină inactivată	6 000	50—430	
C_{4b}		240 000		se fixează pe membrana celulară
C_{5a}		10 000	75	factor chimiotactic
C_{5b}		175 000		se fixează pe membrane celulare
C_6		95 000	60	se fixează pe C_{5b}
C_7		120 000		
C_8		153 000	urme	
C_9		79 000	urme	fosfolipazică
C_x				

nivel relativ constant în tot timpul vieţii. Imunizarea sau hiperimunizarea nu afectează în nici un fel titrul alexinei.

Funcţiile biologice ale complementului sînt multiple; el constituie un factor important al imunităţii naturale, dar participă şi în multiple mecanisme ale imunităţii dobîndite şi hipersensibilităţii în care intervine în mod nespecific, realizînd însă medierea unei mari diversităţi de procese şi reacţii imunologice specifice.

Efectul antimicrobian direct al alexinei asupra unor bacterii nepatogene, mai ales Gram negative, a fost sesizat încă de la începutul secolului nostru. Astfel, P e t t e r s e n (1905) semnalează sensibilitatea unor tulpini de *Proteus vulgaris* la acţiunea serului normal de cobai.

Mult mai importantă este activitatea complementului în imunogeneză şi în reacţiile specifice ale imunităţii dobîndite şi hipersensibilităţii. Intervenţia complementului în aceste procese este condiţionată de prezenţa pe efectorii imuni a unor sedii de cuplare pentru complement. În cazul anticorpilor (imunoglobulinelor), acest sediu de fixare este situat în regiunea numită Fc. La suprafaţa a numeroase cate-

gorii de celule imunocompetente înainte şi după stimularea lor antigenică se găsesc de asemenea astfel de sedii numite receptori Fc.

Principalele mecanisme în care intervine complementul sînt următoarele:

a) în elaborarea răspunsului imun: medierea anumitor forme de cooperare intercelulară, amplificarea unor activităţi biologice ale celulelor imunocompetente (intensificarea sintezei ADN, stimularea multiplicării celulelor în cadrul expansiunilor clonale consecutive stimulării antigenice);

b) în reacţiile dintre antigen şi efectorii imuni umorali: fenomenele de imuncitoliză şi bacterioliză ca de exemplu vibrioliza, imobilizarea treponemelor, imunhemoliza etc.; acest mod de acţiune şi-a găsit bine cunoscuta aplicaţie în cadrul RFC, una din metodele cele mai sensibile şi cu o arie de utilizare din cele mai largi în practica diagnosticului imunologic.

Ulterior, s-au mai imaginat şi alte teste imunologice bazate pe acelaşi mecanism ca fixarea complementului fluorescent, testul Cofal etc. De acelaşi tip este şi acţiunea complementului în cadrul unor forme ale alergiei de tip imediat.

Participarea complementului la reacţiile cu anticorpii umorali este condiţionată de clasa şi subclasa căreia îi aparţin imunoglobulinele. Anticorpii fixatori sînt IgM şi majoritatea subclaselor de IgG. IgA, IgE şi unele subclase de IgG nu fixează de regulă complementul.

În reacţiile dintre antigen şi efectorii celulari ai imunităţii naturale şi dobîndite complementul este un factor de potenţare a fagocitozei, intervenind în fenomenele de opsonizare, imunoaderenţă. Reacţiile de citotoxicitate de tip celular implică şi ele complementul ca factor esenţial, el acţionînd cooperant cu limfocitele T reactive (specific sensibilizate) în producerea efectului citocid asupra celulei ţintă. Asemănător este şi rolul complementului în imunitatea celulară mediată umoral în care acţiunea citocidă se realizează prin celulele K. Aceste mecanisme sînt valabile atît pentru imunitatea celulară, cît şi pentru diferitele forme ale alergiei întîrziate, mai ales în rejecţia alogrefelor. Identică este şi intervenţia complementului în mecanismele imunităţii anticanceroase.

În toate procesele, fenomenele şi reacţiile enumerate mai sus, fără a avea pretenţia de a le fi epuizat pe toate, complementul acţionează prin mecanisme care implică antrenarea, de obicei în lanţ sau în cascadă, a fracţiunilor sale componente.

Modelul care poate fi considerat deja clasic pentru cooperarea complementului cu complexele antigen-anticorp în vederea transformării reacţiei dintr-o formă potenţială într-una efectivă este următorul (fig. 19):

a) cuplarea antigenului cu anticorpul determină deplierea lanţurilor peptidice ale moleculei de imunoglobulină, fenomen care duce la descoperirea (demascarea) sediilor de cuplare pentru complement situate în regiunea Fc;

b) recunoaşterea acestui sediu sau a receptorilor Fc în cazul interacţiunii complementului cu efectorii celulari constituie prima fază a acţiunii complementului; responsabilitatea acestui moment revine celor 3 fracţiuni C_1 care constituie „grupul de recunoaştere", fiecare din ele avînd un rol bine precizat. C_{1q} se cuplează prima la nivelul sediilor menţionate, fiind activată de un radical de triptofan prezent la acest nivel al imunoglobulinei. Fracţiunile activate se notează printr-o linie deasupra simbolului fracţiunii respective; astfel, C_{1q} activat devine $\overline{C_{1q}} \cdot \overline{C_{1q}}$ determină în continuare activarea celorlalte două fracţiuni C_1 şi anume mai întîi a C_{1r} şi apoi a C_{1s}. Activarea acestor 2 fracţiuni necesită prezenţa ionilor Ca^{2+}. Factorul C_{1q} singur este uneori capabil să determine reacţii de liză aşa cum reiese şi din recenta lucrare a lui Ghebrehiwet şi Müller-Eberhard (1978), din

Scanned with OKEN Scanner

care reiese că celule umane de tip limfoblastoid au fost capabile să lizeze eritrocite de pasăre pe care se fixează complementul C_{1q}. Reacţia s-a desfăşurat după tipul celular citotoxic mediat prin anticorpi. În experienţa menţionată, C_{1q} a suplinit prezenţa anticorpilor citofili; nu se poate însă preciza prin ce ligand C_{1q} s-a fixat pe suprafaţa eritrocitelor. C_1, în ansamblul lui, se exprimă prin trecerea într-o formă activă a unei esteraze cu proprietăţi proteolitice asemănătoare cu tripsina;

c) activarea secvenţială a celorlalte fracţiuni implică participarea fracţiunilor C_4, C_2 şi C_3=„grupul de activare". $\overline{C_{1s}}$, prin esteraza deja menţionată, acţionează asupra fracţiunii C_4 scindînd-o într-o subfracţiune mică C_{4a} şi una mare C_{4b}. Această scindare se produce în prezenţa ionilor Mg^{2+}. C_{4b} se adsoarbe pe membranele celulare şi se cuplează cu C_{2a} provenită la rîndul ei din scindarea fracţiunii C_2. Se formează astfel complexul $\overline{C_{4b}C_{2a}}$, care este o enzimă (C_3 — convertaza), avînd ca grupare activă porţiunea C_2.

Activitatea enzimatică a acesteia se exercită asupra substratului reprezentat de fracţiunea C_3, care este scindată în C_{3a} şi C_{3b}. C_{3b} va determina următoarea secvenţă a serialului de activări, acţionînd asupra C_5. Totodată, C_{3b} se poate fixa pe celule determinînd diferite forme de imunoaderenţă exprimate prin facilitarea fagocitozei şi constituirea de rozete. C_{3a}, numită şi anafilatoxina I, are un rol important în declanşarea şocului anafilactic întrucît se fixează şi pătrunde în mastocite, trombocite sau diferite leucocite polimorfonucleare din care determină eliberarea de histamină. După Stockpole şi col. (1978) fracţiunea C_3 poate interveni şi în modularea complexelor antigen-anticorp fapt demonstrat pe şoarece cu antigenul TL (Thymus-Leukemia);

d) producerea efectului de alterare morfofuncţională asupra complexului antigen-anticorp, la care participă restul fracţiunilor C_5—C_9 şi C_x, constituente ale „grupului de atac". Această fază debutează cu formarea unui compus trimolecular $C_{4b,2a,3b}$, cu rol enzimatic faţă de C_5. Această C_5-convertază descompune C_5 în C_{5a} şi C_{5b}. C_{5a} poate acţiona cooperant cu C_{3a} în mecanismul şocului anafilatic prin inducţia eliberării histaminei din diferite celule. C_{5b} se poate combina reversibil cu C_6. Complexul $C_{5b}C_6$ fixează la rîndul lui C_7, rezultînd un nou compus trimolecular $C_{5b,6,7}$ cu rol chimiotactic, formînd o primă unitate potenţială de citoliză. El se poate fixa pe suprafaţa celulelor ţintă fără a produce însă liza sau o altă leziune gravă a acestora. În cazul globulelor roşii, grupul menţionat se fixează în stratul fosfolipidic al dublei membrane şi formează împreună cu eritrocitele (E) complexul $EC_{5b,6,7}$. Liza se produce numai în momentul aderării la acest complex a fracţiunilor C_8 şi C_9. C_8 se ataşează de C_{5b}, iar C_9 de C_8. C_8 dezvoltă lent leziunea membranei celulare, în timp ce C_9 agravează şi accelerează leziunea, finalizînd-o cu liza celulei. În ultimul timp, s-a demonstrat şi intervenţia în această etapă finală a celei de a 12-a fracţiuni C_x semnalată de Müller şi Eberhard, ale cărei constante fizico-chimice sînt deocamdată insuficient cunoscute.

În afară de desfăşurarea reacţiei după dinamica descrisă mai sus se cunosc şi alte căi şi variante de activare a complementului. Astfel, Olivieria (1970) descrie o cale de activare alternativă a complementului, în care iau parte numai componentele C_3 şi seria C_5—C_9. În acest caz, grupa C_1 şi fracţiunile C_2 şi C_4 nu sînt antrenate în reacţie. După un astfel de model se desfăşoară reacţia în cazul antigenelor de tipul complexelor glucido-lipido-polipeptidice (endotoxinele) bacteriilor Gram negative, al unor poliglucide de origine fungică ca zimozanul sau al veninului unor şerpi. Winkelstein şi Tomasz (1978) au arătat

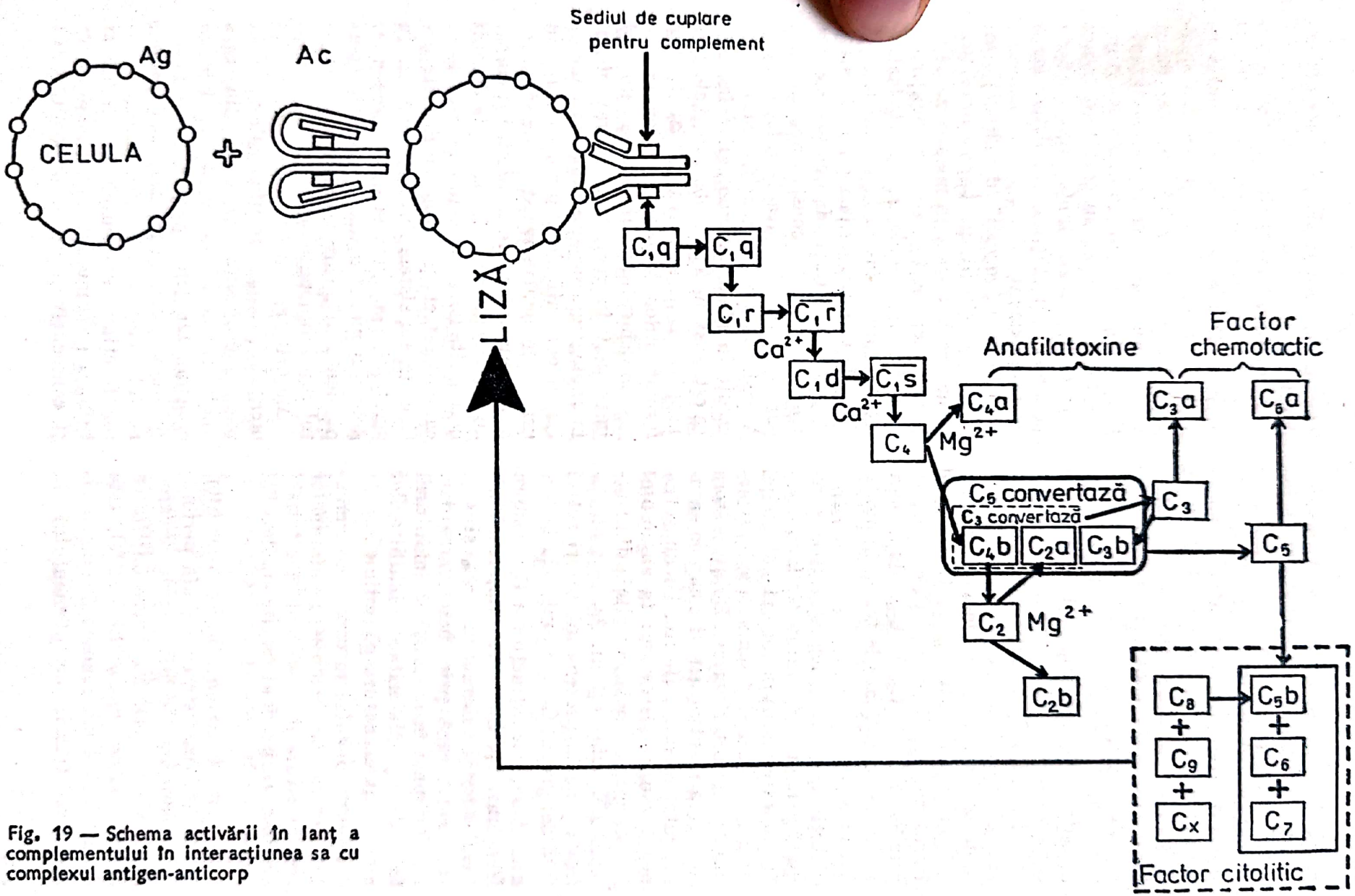


Fig. 19 — Schema activării în lanț a complementului în interacțiunea sa cu complexul antigen-anticorp

Scanned with OKEN Scanner

că acidul teichoic din peretele celular al pneumococilor poate şi el determina activarea complementului pe calea alternativă. Posibilitatea eludării grupului de atac pare a se datora existenţei în ser a unei proteine evidenţiate de Müller şi Eberhard şi numită C_3-proactivator, capabilă să substituie cuplul $C_{4b,2a}$ în producerea C_3-convertazei. La activarea fracţiunii C_3 pe această cale participă şi properdina care acţionează în acest caz prin factorul ei B ca o C_3-proactivator-convertază, scindînd C_3-proactivatorul în două molecule, din care una îndeplineşte rolul de C_3-activator şi într-un mod întrutotul similar cu C_3-convertaza scindează C_3 în C_{3a} şi C_{3b}, după care reacţia se desfăşoară la fel ca în modelul clasic.

Activitatea complementului este reglată prin mecanismul de tip homeostatic în care intervin factori antagonici prezenţi în ser şi desemnaţi sub termenul de „inhibitori serici". Rolul acestora este de a menţine titrul complementului între anumite limite. Ei nu acţionează asupra sistemului în ansamblul lui, ci asupra uneia sau alteia din fracţiuni sau subfracţiuni. Au fost identificaţi pînă în prezent inhibitori activi faţă de: grupul C_1, care intervin împiedicînd acţiunea fracţiunii $\overline{C_{1s}}$ asupra fracţiunii C_4; C_{3b}, care micşorează nivelul acestei subfracţiuni; C_{3a} şi C_{5a}, care acţionează prin inactivarea lor. Au fost puşi în evidenţă şi inhibitori, faţă de C_6. Majoritatea inhibitorilor serici sînt de natură globulinică.

Asupra modului în care complementul determină leziunile membranelor celulare, care duc în final la citoliză, au fost emise mai multe ipoteze şi anume:

a) ipoteza leziunii unice (one-hit), după care liza este consecinţa perforării membranei celulare prin crearea unui singur orificiu; verosimilitatea acestei ipoteze, mai vechi dealtfel, este discutabilă, fiind cunoscută astăzi posibilitatea fixării complementului în mai multe puncte de pe suprafaţa celulei;

b) ipoteza spărturii (leaky patch model), conform căreia complementul activat declanşează sinteza unei substanţe citolitice, care produce o spărtură a învelişului celular prin acţiunea ei asupra lipidelor din membrană. Punctul şubred al ipotezei spărturii constă în aceea că nu corelează latura cantitativă a substanţei lipolitice cu volumul activităţii litice determinate de complement;

c) ipoteza „gogoşii" (doughnut) a lui Mayer (1975), pe baza căreia liza se datoreşte creării în membrana celulară a unei aperturi stabile, menţinută prin formarea unei structuri inelare rigide, care se inseră în straturile lipidice ale membranei într-o formă care a inspirat ca termen de comparaţie cea a unei gogoşi. La constituirea inelului par să participe fracţiunile C_5—C_9. Această ipoteză are astăzi mai mult credit în rîndul imunologilor întrucît ea este susţinută prin observaţii electronooptice care au permis vizualizarea formaţiunilor inelare menţionate.

Complementului îi revine un rol important în realizarea supravegherii imunologice a organismului în concepţia preconizată de Burnet şi prin urmare în menţinerea stării de sănătate a organismului. În medicina umană, au fost identificare în ultimele decenii mai multe boli care s-au dovedit a avea ca substrat etiopatogenetic diferite deficienţe ale sistemului complement. În acest fel, s-a ajuns la conturarea unui domeniu numit astăzi „patologia complementului", care constituie un capitol din imunopatologie.

Majoritatea deficienţelor complementului, cunoscute pînă astăzi, au la bază mecanisme genetice, din care unele transmisibile ereditar. Ele se exprimă fenotipic prin absenţa sintezei uneia sau mai multora din componentele complementului. Lipsa acestor fracţiuni determină la rîndul ei tulburări ale mecanismului de activare şi consecutiv acestora imposibilitatea

Scanned with OKEN Scanner

sau caracterul incomplet al intervenţiei complementului în numeroasele procese imunologice în care el se găseşte implicat.

VII. 2. Properdina

Properdina este un factor umoral complex descris de P i l l e m e r în 1965; este greu de făcut o netă departajare între acţiunea properdinei şi cea a complementului, aceşti 2 factori acţionînd cooperant prin intermediul unei componente comune reprezentată de fracţiunea C_3 a complementului. De aceea, existenţa properdinei ca factor umoral independent de complement a fost multă vreme privită cu oarecare îndoială. Au existat şi oscilaţii în formarea unui punct de vedere clar relativ la componenţii complexului (sistemului) properdinic şi la funcţiile biologice îndeplinite de fiecare fracţiune. Concluzia la care s-a ajuns astăzi consideră properdina ca un complex enzimatic constituit din 5 factori serici şi anume: factorul A, sensibil la acţiunea hidrazinei, factorul B, termolabil, identificabil cu proactivatorul C_3, factorul D, factorul E şi factorul P, care interacţionează cu zimozanul şi alte complexe glucidice. Un rol important în acţiunea sistemului properdinic a fost atribuit şi ionilor Mg^{2+}. Sistemul properdinic îndeplineşte rolul de activator al complementului, interacţiunea celor 5 factori desfăşurîndu-se în aproximativ următoarea dinamică: factorul P intră în combinaţie cu anumite poliglucide insolubile şi activează factorul A, care împreună cu factorul D (substituibil cu veninul de cobra) activează factorul B; acesta modifică factorul E, care devine capabil să activeze fracţiunea C_3 a complementului, care la rîndul ei activează întregul sistem complement.

O altă schemă după care properdina intervine în mecanismul activării alternative a complementului este redată mai detaliat într-o lucrare de sinteză de către A u s t e n (1978) în felul următor:

factorul C_{3b} rezultat din scindarea lui C_3 (identic după S ö t z e şi E b e r h a r d cu factorul A al sistemului properdinic activat) se fixează pe celulă şi se leagă reversibil de factorul original properdinic B, în prezenţa ionilor de magneziu; acest complex expune un situs al factorului B care este sensibil la acţiunea unei proteine adiţionale, o serin-esterază notată D. Partea cea mai mare a fragmentului B rămîne legată de C_{3b} formînd un complex biomolecular labil C_{3b} B_b care determină factorul C original să activeze celelalte fracţiuni ale complementului, îndeplinind în acest fel rolul unei C_3 convertaze. Funcţia proteolitică a acesteia ţine de B_b, dar se exprimă numai în forma legată de C_{3b}. Acţiunea enzimatică a acestei convertaze poate fi inhibată de proteina B 1 H, care desparte C_{3b} de B_b.

Properdina are un efect antibacterian faţă de numeroşi germeni, mai ales Gram negativi, un anumit grad de activitate antivirală, manifestată mai ales faţă de unii bacteriofagi şi foarte probabil şi o acţiune anticanceroasă, dacă se ia în considerare constatarea că în formele avansate ale bolii canceroase titrul properdinei se reduce sensibil. Ca şi complementul, properdina trebuie considerată ca un factor activ umoral al imunităţii naturale. M a r i n e s c u (1972) apreciază că dozarea properdinei ar putea constitui un test de sondare a rezistenţei naturale antiinfecţioase a organismului.

Scanned with OKEN Scanner

VIII Potenţarea şi diminuarea răspunsului imun. Toleranţa imunologică

VIII. 1. Potenţarea răspunsului imun

Intensitatea răspunsului imun poate fi mărită prin acţiunea nespecifică a unui variat sortiment de structuri celulare, substanţe organice sau anorganice, desemnate sub termenul generic de substanţe adjuvante.

Rolul de adjuvant este dependent de capacitatea de legare covalentă cu antigenul şi poate fi îndeplinit de următoarele categorii de entităţi morfologice sau chimice:

— corpi bacterieni din culturi inactivate ale unor specii de *Mycobacterium*;

— proteine omoloage sau heteroloage; efectul adjuvant al proteinelor străine este mai mare decît al celor proprii. Anticorpii au şi ei un efect adjuvant proporţional cu afinitatea lor pentru proteinele din organism;

— lipide, în general cele complexe cum sînt cerurile şi diferite uleiuri, ca oleul de parafină, produsele „Bayol F" şi „Arlacel A";

— glucide, de regulă polizaharide ca geloza sau glicozide ca saponina;

— complexe organice lipo-glico-proteice, cum este ceara D, un component al peretelui celular al micobacteriilor constituit din acizi micolici, mono- şi dizaharide şi peptide sau endotoxinele bacteriilor Gram negative. Produşi asemănători cu unele fracţiuni bacteriene subcelulare au fost obţinuţi şi pe cale sintetică. Astfel Specter şi col. (1978) experimentează efectul adjuvant al muramil-dipeptidei, care s-a dovedit a avea o acţiune foarte asemănătoare cu unele componente ale peretelui celular al micobacteriilor cu care dealtfel se aseamănă şi chimic;

— compuşi minerali, dintre care cea mai largă arie de aplicabilitate în medicina veterinară îl are gelul de hidroxid de aluminiu;

— adjuvanţi complecşi constituiţi din amestecuri de ingrediente din categoria celor deja menţionate, cum este adjuvantul Freund preparat dintr-un ulei (ulei de parafină sau Bayol F) în care se include antigenul, obţinîndu-se o emulsie fină. În acest scop, antigenul se amestecă în prealabil cu un emulgator (lanolină sau Arlacel A), care conferă emulsiei stabilitatea necesară. În final, se adaugă o suspensie de micobacterii inactivate (de obicei *Mycobacterium phlei*).

Mecanismele prin care substanţele adjuvante intervin în potenţarea răspunsului imun pot fi sistematizate pe următoarele moduri principale de acţiune:

— creşterea gradului de remanenţă a antigenului în organism, prin crearea de depozite, din care antigenul se eluează treptat; acest mod de acţiune este caracteristic mai ales pentru adjuvantul Freund şi hidroxidul de aluminiu;

— stimularea afluxului şi a proliferării celulelor imunocompetente; endotoxinele bacteriilor Gram negative şi ceara D au un efect mitogen asupra limfocitelor B; muramil-peptida induce o expansiune policlonală;

— facilitarea difuziunii antigenului, rol îndeplinit în special de adjuvanţii uleioşi constituiţi împreună cu antigenul în emulsii, care permit o bună vehiculare şi distribuire a antigenului în organele limfoide şi în tot organismul;

— influenţarea în sens favorabil a prelucrării intrafagocitare în macrofag a antigenului; saponina şi endotoxinele bacteriilor Gram negative împiedică digestia totală a antigenului prin alterarea lizozomilor;

— stimularea reacţiei celulare prin instalarea unei alergii întîrziate de tip IV produsă de micobacteriile din adjuvantul Freund.

Adjuvanţii şi-au găsit multiple aplicaţii practice la pregătirea antigenelor pentru hiperimunizarea donatorilor de ser (mai ales adjuvantul Freund), cît şi în prepararea a numeroase vaccinuri cu largă utilizare în medicina veterinară, după cum urmează: hidroxidul de aluminiu pentru majoritatea vaccinurilor antibacteriene şi unele vaccinuri antivirotice inactivate, pentru anatoxina tetanică şi unele vaccinuri vii (vaccinul antirabic), saponina pentru vaccinul anticărbunos, cristalul violet pentru unul din vaccinurile antipestoase porcine etc.

VIII. 2. Diminuarea sau suprimarea răspunsului imun

Diminuarea sau suprimarea răspunsului imun determină în organism starea numită imunosupresie (imunodepresie), ca urmare fie a alterării funcţiilor vitale ale celulelor imunocompetente prin diferiţi factori nespecifici — fizici, chimici, biologici — fie a intervenţiei pe parcursul răspunsului imun a limfocitelor T_1 imunosupresoare. O formă particulară a imunosupresiei este toleranţa imunologică faţă de un anumit antigen, care în unele cazuri este posibilă şi fără participarea celulelor T_1.

Imunosupresia (imunodepresia) prin factori nespecifici se realizează prin alterarea morfofuncţională a sistemului celular imunocompetent. Factorii imunosupresivi pot fi clasificaţi în funcţie de natura şi modul lor de acţiune, după cum urmează:

f a c t o r i f i z i c i, dintre care cei mai activi sînt razele X; ele inhibă proliferarea celulelor imunocompetente, inhibînd mitoza prin tulburarea funcţiilor ADN;

f a c t o r i c h i m i c i, care pot fi împărţiţi în funcţie de modul lor de acţiune, în mai multe categorii şi anume:

— substanţele antihistaminice de tipul Fenerganului şi Romerganului, care acţionează antagonic cu histamina;

— analogii bazelor purinice şi pirimidinice ca 6 mercaptopurina, 6 tioguanina, 5 fluorouracilul, care acţionează antimitotic ca antimetaboliţi ai ADN, ARN şi diferitelor coenzime;

— agenţii alkilanţi, ca de exemplu ciclofosfamida, care au un efect puternic inhibant asupra sintezei ARN şi ADN;

— antagoniştii acidului folic, ca de exemplu methotrexatul sau ametopterina, care au tot un efect antimitotic;

— unele antibiotice ca de exemplu cloramfenicolul, care interferează cu ARN, inhibînd sinteza imunoglobulinelor;

Scanned with OKEN Scanner

factori biologici, care se încadrează în 2 grupe mai importante:

— hormonii, cu efect antiinflamator, de tipul corticosteroizilor; cortizonul și ACTH-ul mai frecvent utilizați pentru acțiunea lor imunosupresivă determină involuția țesutului limfoid și deprimă reacțiile inflamatorii în general, inclusiv fagocitoza;

— serul antilimfocitar preparat pe animale donatoare prin hiperimunizarea acestora cu suspensii de limfocite, acționează prin inhibarea proliferării limfocitelor.

Medicația imunosupresivă se aplică în terapia bolilor autoimune și pentru a mări capacitatea de toleranță a organismului față de grefe.

Imunosupresia indusă prin stimularea celulelor T imunosupresive se caracterizează prin abateri de la tipul normal de recepționare a semnalelor și de transmitere a lor în cadrul mecanismelor de cooperare intercelulară, avînd un rezultat final opus răspunsului imun (răspuns imun negativ). Principalii efectori ai răspunsului imun negativ îl constituie limfocitele T_1 imunosupresive, al căror mod de acțiune precis nu este deocamdată pe deplin elucidat.

Limfocitele T_1 imunosupresive sînt opozabile celulelor T_2 helper, de care se deosebesc printr-o serie de însușiri ca: prezența unor markeri antigenici Ly specifici, radiosensibilitatea, prezența receptorilor Fc și stabilitatea sediului, principalul organ în care sînt localizate fiind splina. Ele derivă din timocitele cortizon-sensibile, în timp ce limfocitele T_2 helper provin din cele cortizon-rezistente; aceste proprietăți ale celulelor de origine pledează pentru diferențierea lor pe parcursul dezvoltării ontogenetice înaintea celulelor T_2 helper.

Procesele imunologice în care intervenția lor este foarte probabilă sînt următoarele:

— incapacitatea unor linii genetice de a reacționa prin răspuns imun (calitatea de „non responder"), fapt dovedit experimental de Benacerraf și col. (1974) pentru unele linii pure de șoareci față de anumite antigene sintetice;

— supresia răspunsului imun față de anumite antigene cu caracter individual în cadrul speciilor și liniilor, care în mod obișnuit dau un răspuns imun;

— toleranța imunologică, ce nu se deosebește ca efect de starea menționată anterior, dar în al cărei mecanism de producere intervenția celulelor T_1 pare să nu fie totdeauna obligatorie.

Cu toate că asupra cunoașterii modului de acțiune al celulelor T_1 imunosupresive planează încă multe necunoscute, se presupune că ele sînt implicate în cooperarea intercelulară T-B. Cooperarea T_2 helper — B determină activarea celulelor B, expansiunea lor clonală, transformarea în plasmocite și producția de imunoglobuline. Cooperarea T_1 supresor→T_2 helper sau direct T_1-supresor→B determină un efect contrar asupra mecanismului căruia au fost emise două ipoteze mai importante:

— ipoteza emisă de Tada și col. (1975), după care celulele T_2 helper stimulate antigenic emit semnale chimice declanșante atît pentru expansiunea celulelor B, cît și a celulelor T_1 supresoare; în funcție de predominența unora sau altora se va dezvolta un răspuns imun sau se va produce supresia acestuia;

— ipoteza lui Gershon (1975), care pleacă de la premisa că antigenul declanșează într-o primă etapă expansiunea celulelor T_1 supresoare, iar răspunsul imun se dezvoltă numai dacă apar semnale de contramandare a expansiunii acestora.

Factorul supresiv descris de Tada și col. (1975) prin care acționează celulele T_1 este asemănător din punct de vedere fizico- și imunochimic cu cel evidențiat de Taussig și Munro (1975) în mecanismul cooperării T-B pentru transferul mesajului antigenic între cele 2 tipuri de limfocite. Numai că factorul supresiv rămîne fixat pe celula T_1 și conferă acesteia proprieta-

Scanned with OKEN Scanner

tea de a acționa asupra limfocitului T_2, ca asupra unei celule țintă și nu se exfoliază în vederea transferării pe o celulă B. Determinismul genetic al celor doi factori este identic, ambii fiind codificați de genele Ir.

În afară de limfocite T_1, în determinismul supresiei pot interveni și macrofagele, așa cum rezultă din numeroase date de literatură printre care, de dată mai recentă pot fi menționate următoarele: Lee și col. (1978) evidențiază macrofage imuno-supresoare induse la pui cu virusul bolii lui Marek; Coulis și col. (1978) atribuie macrofagelor responsabilitatea unei stări imunosupresive produse la șoarece de parazitul *Schistosoma mensoni*; Ishizaka și col. (1978) fac observații similare tot pe șoareci inoculați experimental cu sulfat de poligalactoză. În inducția supresiei pot interveni și compuși subcelulari. Astfel Taniguchi și Miller (1978) au obținut un factor imunosupresor specific din extracte de celule splenice de șoarece la care a fost indusă o stare de toleranță imunologică față de gammaglobulina umană dezagregată. Sinteza factorului era codificată de regiunea I a locusului major de histocompatibilitate. Prin proprietățile sale acest factor s-a dovedit a fi foarte apropiat de cel din celulele T_1. Pe baza acestor constatări autorii concluzionează în sensul necesității admiterii existenței unei clase majore de molecule imunoregulatoare, de natură neimunoglobulinică, capabile să intervină în medierea supresiei antigen specifice T-dependente.

VIII. 3. Toleranța imunologică

Toleranța imunologică este incapacitatea organismului de a produce efectori imuni față de un antigen dat și reprezintă o variantă a imunosupresiei caracterizată prin unele particularități de mecanism. Astfel, în timp ce în imunosupresie intervenția macrofagelor pare a fi obligatorie, în instalarea toleranței participarea lor nu este indispensabilă. Același lucru este valabil, cel puțin în unele stări de toleranță, și pentru limfocitele T_1 -imunosupresive. Există de asemenea diferențe în ce privește durata celor două stări. Cu toate acestea, nu se poate face totdeauna o departajare netă între imunosupresie și toleranță.

Se poate admite că fiecare organism prezintă o toleranță naturală stabilă față de toți compușii chimici „self", care pentru o altă specie sînt antigenici. Conform teoriei selecției clonale a lui Burnet (vezi pag. 135), această toleranță ar fi indusă în perioada dezvoltării embrionare.

Toleranța față de structuri și compuși „non self" poate fi indusă în diverse etape ale dezvoltării ontogenetice.

Inducția toleranței depinde de mai mulți factori, dar în special de proprietățile antigenului. Unul și același antigen, în funcție de doză și de alți factori, poate avea un efect „imunogen" sau „tolerogen".

Tolerogenitatea este o însușire mai frecventă la antigenele cu un grad mai mare de remanență în organism.

În funcție de doza inductoare de antigen pot fi deosebite în condiții experimentale două tipuri de toleranță: toleranță de doză joasă (low zone tolerance) și de doză înaltă (high zone tolerance).

Toleranța de doză joasă este determinată de stimularea celulelor T_1 supresoare și are la bază mecanismele ipotetice menționate anterior. În doze mici, antigenul își exercită efectul stimulator asupra celulelor T_1 supresoare în locul celulelor T_2 helper.

Scanned with OKEN Scanner

Toleranţa de doză înaltă nu include în mecanismul ei participarea celulelor T_1 supresoare. Antigenul în cantitate mare se fixează direct pe suprafaţa celulelor B blocînd rapid şi aproape concomitent toţi receptorii pentru antigen; în acest fel, limfocitul B nu mai poate fi activat şi nu mai evoluează în sensul transformării lui în celulă anticorpoformatoare.

Scanned with OKEN Scanner

IX Elemente de imunogenetică

Imunogenetica este o tînără disciplină de graniță, constituită în ultimii ani, al cărui obiect îl formează studiul mecanismelor genetice ale imunogenezei, al determinanților genetici ai efectorilor imuni și ai controlului genetic al tuturor proceselor de variație a acestora.

IX. 1. Baza genetică a răspunsului imun

Răspunsul imun este controlat genetic de mai multe tipuri și ansambluri de gene din celulele imunocompetente.

Sistemul de histocompatibilitate (HC) este reprezentat de gene care codifică sinteza antigenelor de histocompatibilitate prezente pe suprafața tuturor celulelor din organism. Antigenele HC sînt aceleași pentru toate țesuturile aceluiași individ și sînt prezente pe toate tipurile de celule, inclusiv cele imunocompetente. În funcție de intensitatea reacției de respingere a grefei, antigenele HC se împart în tari și slabe. Sinteza celor două tipuri de antigene este codificată de gene HC cu loci diferiți. Gena care ocupă un locus HC, indiferent dacă aceasta codifică un antigen slab sau tare, se poate prezenta sub mai multe forme alelice diferite. De exemplu, la șoarece gena H-2 se poate prezenta sub multiple forme alelice: $H\text{-}2_a$, H-2 , $H\text{-}2^c$ etc.

În succesiunea generațiilor, genele HC suferă însemnate variații ca rezultat al segregării și reasortării alelelor. De aceea, antigenele HC diferă chiar între indivizii aceleiași specii.

Fiecare individ este caracterizat din punct de vedere al genelor HC de pe cromozom și implicit al antigenelor HC aferente printr-o configurație dată, desemnată cu termenul de „haplotip". În cazul organismelor superioare, care sînt toate diploide, fiecare celulă va purta două haplotipuri identice sau diferite, după cum indivizii sînt homo- sau heterozigoți.

Între indivizii din specii diferite și din aceeași specie pot fi deosebite următoarele tipuri de relații din punct de vedere al haplotipurilor componente:

— relațiile xeno sau heterogenice, implică indivizi din specii diferite, cu foarte pronunțate diferențe privind antigenele HC;

— relațiile alogenice se referă la indivizii heterozigoți din aceeași specie care diferă între ei prin ambele haplotipuri, după o schemă de tipul $H\text{-}2^{a/a}$ — $H\text{-}2^{b/b}$;

— relațiile hemialogenice sau semisingenice sînt tot în cadrul aceleiași

Scanned with OKEN Scanner

specii, între indivizi heterozigoţi care diferă numai printr-un singur haplotip, conform unei scheme de tipul $H\text{-}2^{a/a}$ — $H\text{-}2^{a/b}$;

— relaţiile singenice corespund indivizilor homozigoţi din liniile pure şi sînt caracterizate prin identitatea haplotipurilor, avînd aceeaşi variantă alelică situată pe acelaşi locus HC, exprimabilă printr-o schemă de tip $H\text{-}2^{a/a}$ — $H\text{-}2^{a/a}$ sau prescurtat H-2 .

Determinismul genetic al sistemelor HC a fost bine studiat în două categorii de fenomene şi anume în comportarea faţă de grefe şi în reactivitatea imunologică.

Transplantele la acelaşi individ dintr-o regiune anatomică la alta (autografele) şi cele de la un individ la altul în cazul unor relaţii singenice între donator şi receptor (izografe) sînt bine tolerate, în timp ce grefele de la donatori către acceptori heterozigoţi între care relaţiile sînt de tip hemialogenic, alogenic (alografe) şi xenogenic (xeno sau heterografe) sînt de regulă respinse. Reacţia de respingere (rejet sau rejecţie) din partea organismului pe care se fixează grefonul este cu atît mai puternică cu cît diferenţele antigenice determinate de haplotipurile donatorului şi receptorului sînt mai diferite. Responsabilitatea rejecţiei revine acţiunii efectorilor imuni elaboraţi prin răspunsul imun faţă de heteroantigenele HC de pe suprafaţa celulelor grefonului. Răspunsul imun anti-grefă este de tip predominant celular, fiind incadrabil în alergia întîrziată de tip IV.

Reactivitatea imunologică a organismului s-a dovedit a fi de asemenea determinată genetic de sistemul HC. Calitatea de reactiv (responder) şi nereactiv (non responder) sînt caractere transmisibile în succesiunea generaţiilor după legile mendeliene. Investigarea poziţiei genelor responsabile de caracterele R (reactiv) şi N (nereactiv) a permis identificarea a 2 categorii de gene: a) gene situate în apropierea locusului HC major şi b) gene situate la alte nivele ale genomului celular cum ar fi cromozomul X, limitrof locilor HC minori sau genelor care controlează variaţiile alotipice ale lanţurilor H (la şoarece). Genele din categoria a se exprimă fenotipic în cadrul cooperării T—B implicate în răspunsul imun umoral faţă de antigenele T dependente. Cele din categoria b controlează mecanismele recunoaşterii imunologice a antigenelor la suprafaţa celulelor imunocompetente, mai ales a antigenelor T independente la nivelul linfocitelor B. După G h y k a (1977), structurile genetice din categoria a pot fi considerate ca alcătuind „sistemul de imunogenitate", iar cele din categoria b, „sistemul de specificitate".

a) *Genele din locusul major de histocompatibilitate*

— S i s t e m u l d e i m u n o g e n i t a t e ş i g e n e l e I r (Imunoreactivitate). Genele Ir sînt legate de loci HC majori şi controlează fiecare caracterul R sau N faţă de un antigen dat. Genele Ir exercită un control de o extremă rigurozitate în capacitatea de distingere a detaliilor în structura antigenelor. O infimă diferenţă în structura antigenului constînd de exemplu în prezenţa, respectiv absenţa, sau o simplă modificare de poziţie a unui singur aminoacid poate fi sesizată de genele Ir determinînd schimbarea caracterelor N sau R.

Cercetările privind amplasarea genelor Ir la şoarece au stabilit că acestea se găsesc în interiorul locusului major de histocompatibilitate H-2 în regiunea desemnată cu simbolul I (Immune response).

În cadrul regiunii I se disting 3 subloci notaţi I-A, I-B şi I-C. Limitrof regiunii I se găsesc regiunile D, S şi K care controlează sinteza unor glicoproteine de membrană (D şi K) şi a unor proteine serice (S). S-a demonstrat că răspunsul imun la un antigen dat este controlat de una şi în rare cazuri de 2 gene Ir.

Regiunea I codifică sinteza unor antigene de suprafaţă notate cu simbolul

Scanned with OKEN Scanner

Ia (Immune associated) prezente mai ales pe limfocitele B şi în proporţie mai redusă pe celulele T. Principalul rol al antigenelor Ia constă în medierea cooperării intercelulare T-B, fapt pentru care au mai fost denumite şi molecule reglatoare ale interacţiunilor celulare (cells interacting molecules.)

Defectele genetice privind genele Ir au consecinţe asupra posibilităţilor de cooperare T—B. În cazul cînd sînt localizate în celulele T, determină dificultăţi în transmiterea informaţiei către celulele B, iar dacă se găsesc la nivelul acestora din urmă, determină inaccesibilitatea recepţionării stimulului antigenic de către limfocitele B (antigenul Ia de pe suprafaţa celulelor B a fost identificat ca acceptorul de stimul T). Consecinţe asemănătoare sînt provocate de defectele genelor Ir şi în cooperarea T-helper-T-efector în mecanismul imunităţii mediate celular, după cum şi în cooperarea T-supresor-B în mecanismul imunosupresiei. Intervenţia genelor Ir în diferitele variante de cooperare intercelulară se exprimă fenotipic prin sinteza „factorului" de pe suprafaţa celulelor T, care împreună cu receptorul Ig şi antigenul constituie complexul exfoliabil transferabil pe celulele B.

Defectele genelor Ir nu influenţează sensibil răspunsul imun faţă de antigenele T-independente, nici prima fază a răspunsului imun primar în care predomină sinteza IgM. Ele se fac simţite numai în cazul antigenelor T-dependente, în a doua fază a răspunsului primar şi în răspunsul secundar în care are loc sinteza IgG şi în care cooperarea intercelulară T-B este indispensabilă. Aceste date, confirmate experimental de Green, Paul şi Benaceraff (1972), demonstrează existenţa unei baze genetice a diferenţierii între antigenitate şi imunogenitate, în cadrul răspunsului imun. Imunogenitatea implică obligativitatea cooperărilor T-B sau T-T, sinteza IgG şi reclamă o stare intactă a genelor Ir, a întregii regiuni I în general şi a tuturor structurilor genetice, care ocupă locusul major de histocompatibilitate.

b) *Genele din loci minori de histocompatibilitate*

Sistemul de specificitate şi genele *V*. Genele V sînt responsabile de specificitatea efectorilor imuni faţă de antigen. Ele nu sînt niciodată legate de locusul major HC şi exercită controlul genetic al configuraţiei stereochimice a situsurilor combinative (valenţelor, sediilor de cuplare) ale anticorpilor. Acţiunea genelor V reprezintă un mecanism genetic de mai mare fineţe şi mai evoluat, comparativ cu cel al genelor Ir şi al ansamblului de gene situate pe locusul major HC. Apariţia acestui mecanism în filogeneză se situează pe o treaptă superioară sistemului I responsabil pentru imunogenitate.

IX. 2. Determinanţii genetici ai imunoglobulinelor

Sinteza lanţurilor polipeptidice constituente ale imunoglobulinelor, are loc în plasmocit după dinamica deja descrisă.

Ea se desfăşoară separat pentru lanţurile H şi L. Plecînd de la premisa că numărul probabil de anticorpi, care pot fi sintetizaţi de un organism la aproximativ 10^8, pentru care sînt necesare 10^4 lanţuri H şi 10^4 lanţuri L şi acceptînd că sinteza fiecărui lanţ este codificată de cîte o genă distinctă, rezultă că în anticorpogeneză sînt implicate aproximativ 20 000 gene.

Cercetările pentru elucidarea substratului genetic al celor trei tipuri de variaţii ale imunoglobulinelor (izotipică, alotipica şi idiotipică), deja descrise, au permis identificarea majorităţii factorilor genetici determinanţi ai fiecărui tip de variaţie.

Determinismul genetic al variaţilor

Scanned with OKEN Scanner

izotipice. Variaţia izotipică reprezintă un caracter genetic de specie, transmisibil ereditar. Clasele şi subclasele de imunoglobuline nu segregă şi nu variază în funcţie de genotipul părinţilor. Genele determinante ale izotipurilor au un caracter nonalelic.

Investigarea materialului genetic care intervine în codificarea regiunilor variabile şi constante ale lanţurilor L şi H ale imunoglobulinelor au avut ca rezultat stabilirea următoarelor grupe de variabilitate:

În structura regiunilor variabile — o grupă pentru lanţurile $\varkappa$, în cadrul căreia au fost identificate la om trei subgrupe notate $V\varkappa$ I, $V\varkappa$ II şi $V\varkappa$ III; una pentru lanţurile λ cu cel puţin 5 subgrupe şi una pentru lanţurile H, divizibilă la om în trei subgrupe V_H (după Fougereau, 1975); numărul minim de cistroni în care este depozitată informaţia genetică corespunzătoare acestor variaţii se situează deci cu aproximaţie în jurul cifrei 11.

În structura regiunilor constante — pentru lanţurile $\varkappa$ un singur tip la om şi 2 la iepure, notate $\varkappa_A$ şi $\varkappa_B$; pentru lanţurile λ au fost evidenţiate la om trei tipuri de secvenţe. Două din ele situate în poziţia 190 (factorul „0Z") diferă numai prin inversarea poziţiilor perechii de aminoacizi lizină-arginină, iar a treia, ocupînd poziţia 154 (factorul „KERN") rezultă din permutarea perechii glicină-serină. Pentru lanţurile H, grupele corespund claselor şi subclaselor (4 pentru γ, 2 pentru α, 2 pentru μ, 1 pentru δ şi 1 pentru ε). Regiunile constante sînt, prin urmare, sintetizate conform informaţiei genetice stocate într-un număr minim de 14 cistroni.

Analiza de detaliu a grupelor şi subgrupelor de variabilitate izotopică a dus la concluzia, aşa cum reiese din datele de mai sus, că numărul de gene care codifică sinteza regiunilor variabile ale lanţurilor de imunoglobuline nu este identic cu cel care codifică sinteza regiunilor constante.

Această disjuncţie numerică dintre genele V şi C permite o oarecare libertate în asocierea C—V în cadrul fiecărei grupe. După Edelman şi Gall (1969), asamblarea genelor responsabile pentru sinteza imunoglobulinelor se poate face după trei tipuri de translocare: $V_\varkappa - C_\varkappa$, $V_\lambda - C_\lambda$ şi $V_H - C_H$.

Cu privire la modul în care se produce legarea V—C în timpul sintezei imunoglobulinelor au fost emise două ipoteze care încearcă să explice fenomenele de variabilitate în extrema lor finete:

— ipoteza germinală, conform căreia există atîţia cistroni cîte feluri de lanţuri diferite prin structură, numărul acestora fiind în jurul de 100—200 de fiecare tip de lanţ $\varkappa$, λ sau H;

— ipoteza „zgomotelor de fond", care corelează fenomenele de variabilitate cu mutaţiile somatice şi cu polimorfismul genetic.

Fougereau (1975) încearcă să combine cele două ipoteze admiţînd posibilitatea ca variaţiile din zonele relativ puţin supuse fenomenelor de variabilitate, atît în regiunile C, cît şi în regiunile V, să fie codificate de un număr nu prea mare de aproximativ 100 de gene, în timp ce variaţiile din zonele intens afectate de aceste fenomene (regiunile hipervariabile) să fie rezultatul unor procese somatice.

Determinismul genetic al variaţiilor alotipice. Variaţiile alotipice ale imunoglobulinelor, care apar la grupe de indivizi din aceeaşi specie, reprezintă expresia variantelor genelor de structură, constituind totodată pentru acestea markeri, care în succesiunea generaţiilor, sînt supuşi legii segregării mendeliene. Genele determinante pentru specificitatea alotipică au caracter de alele.

Studiul efectuat de Oudin (1956) asupra specificităţii alotipice a imunoglobulinelor de iepure a permis punerea în evidenţă la această specie a două serii de alele situate în doi loci diferiţi notaţi a şi b. Fiecare serie este

Scanned with OKEN Scanner

constituită din cîte 3 alele şi anume, seria a din Aa 1, Aa 2 şi Aa 3, iar seria b din Ab 4, Ab 5 şi Ab 6. Alelele seriei a se exprimă fenotipic la nivelul fragmentelor Fab ale lanţurilor grele γ, în timp ce cele din seria b se exprimă pe lanţurile uşoare ϰ. Segregarea celor două serii de alele se produce independent una de alta fapt care, atestă existenţa unui control genetic al lanţurilor grele de cele uşoare ϰ prin cistroni distincţi.

La acelaşi iepure, o moleculă de IgG, indiferent de alotip, conţine un singur tip de lanţ γ şi un singur tip de lanţ ϰ. Inexistenţa unor molecule de IgG hibride se explică prin fenomenul de „excludere alelică" sau „haploidie funcţională".

Specificitatea determinată de alelele seriei b poate fi regăsită în cadrul tuturor claselor de imunoglobuline, avînd în vedere uniformitatea lanţurilor K, indiferent de clasă sau subclasă.

În afara seriilor bine studiate a şi b, au mai fost identificaţi la iepuri următorii markeri de specificitate alotipică:

— pe lanţurile uşoare γ s-a evidenţiat exprimarea seriei C, considerată mai mult ca pseudoalelică, situată în locusul c şi prezentă în două variante alelice C_7 şi C_{21};

— pe lanţurile grele se pot exprima serii de alele situate în loci diferiţi în funcţie de regiunea şi clasa de imunoglobuline. Regiunile constante ale lanţurilor γ sînt codificate de alele din loci d (A_{11} şi A_{12}) şi e (A_{14} şi A_{15}); lanţurile μ de alele din locusul n (n 81 şi n 82); lanţurile α de alele din loci f (f 71, f 72 şi f 73) şi g (g 74 şi g 75). Regiunile variabile sînt determinate genetic de alele din loci x (x^{32} şi x^-) şi y (y^{33} şi y^-).

Analiza markerilor alotipici ai imunoglobulinelor la şoarece a dus la identificarea a 3 tipuri de specificitate alotipică notate IgG 2a, IgG 2b şi IgA, pentru care s-au pus în evidenţă respectiv 8,6 şi 5 alele.

La om, markerii alotipici au fost încadraţi în 4 sisteme de factori notate Gm, Inv, Am şi ISf.

Sistemul Gm se exprimă la nivelul lanţurilor γ, în special în fragmentele Fc şi uneori şi fragmentele Fd; au fost identificaţi 25 factori Gm, fără a fi epuizată posibilitatea evidenţierii pentru unele subclase de IgG (de exemplu pentru lanţul γ_4) a noi markeri Gm, necunoscuţi pînă în prezent. Notarea factorilor Gm s-a făcut cu cifre arabe sau cu litere mici din alfabetul latin, la care s-a renunţat în ultimii ani pe baza recomandării OMS. Fiecare subclasă de IgG se caracterizează printr-o anume combinaţie de factori Gm. Aceştia segregă la descendenţi după legile mendeliene. De-a lungul vieţii, tipurile Gm se caracterizează printr-o remarcabilă stabilitate, indiferent de evoluţia stărilor imunologice.

Sistemul Inv este situat pe un cromozom diferit de Gm. Factorii Inv se exprimă în regiunea constantă a lanţurilor uşoare ϰ. Au fost descrise 3 alele Inv. Inv 1 şi Inv 3 se exprimă prin inversarea poziţiei perechii de aminoacizi leucină-valină, localizată în poziţia 191 a lanţurilor ϰ. Cei trei factori se pot găsi în diferite combinaţii, determinînd diverse genotipuri şi fenotipuri Inv.

Sistemul Am este legat exclusiv de lanţurile grele α_2, se exprimă fenotipic numai în Ig A 2 sub forma a doi factori antigenici Am 1 şi Am 2, asupra cărora există dubii dacă sînt consecinţa a 2 alternative de tip alelic sau reprezintă expresia unor gene cu poziţii diferite pe lanţul de ADN.

Sistemul ISf, prezent numai în cadrul subclasei IgG 1, exprimabil în 2 fenotipuri ISf (1) şi (ISf (-1), este situat pe fragmentul Fc al lanţurilor grele γ1 şi variază în funcţie de vîrsta individului; i se atribuie un rol în şocurile posttransfuzionale în cazul cînd donatorul şi acceptorul sînt distincţi din punct de vedere al fenotipului ISf.

Determinismul genetic al variaţiilor idiotipice. Variaţiile idiotipice apar

Scanned with OKEN Scanner

la un singur individ dintr-o specie şi se caracterizeză printr-o structură antigenică a unui anticorp faţă de un antigen dat, cu caracter de unicat. Substratul chimic al specificităţii idiotipice rezidă într-o anumită compoziţie în aminoacizi şi o aranjare a acestora în lanţurile uşoare şi grele cu un caracter strict individual. Localizarea particularităţilor idiotipice se găseşte la nivelul regiunilor variabile ale lanţurilor L şi H.

Baza genetică a acestor unicate poate fi de natură poligenică în care caz ele se transmit ereditar; se pare însă că nu toate variaţiile idiotipice sînt înscrise în genom, unele fiind de origine somatică. Acestea nu se transmit ereditar. S-a mai emis şi ipoteza după care transmiterea ereditară este inconstantă în cazul cînd determinanţii genetici ai idiotipului sînt localizaţi în zona care codifică regiunile hipervariabile ale lanţurilor L şi H.

Un fenomen genetic interesant privind transmiterea ereditară a specificităţii idiotipice a fost descris de Oudin şi Cazenave, care inoculînd diferiţi antigeni proteici la iepure, au obţinut anticorpi cu diferite specificităţi idiotipice. Prin inoculare de sero-albumină umană, autorii au obţinut anticorpi faţă de diferitele fracţiuni albuminice aparţinînd aceluiaşi idiotip. În cazul inocularii însă a doi antigeni diferiţi, anticorpii vor aparţine unor idiotipuri diferite. Mecanismul genetic al acestei comportări aparte din punct de vedere al variabilităţii anticorpilor numit de Jerne „paradoxul Oudin-Cazenave" nu este deocamdată clarificat.

IX. 3. Baza genetică a unor procese imunopatologice

Determinismul genetic al tulburărilor în producţia de efectori imuni. Sinteza imunoglobulinelor poate fi dereglată prin diminuarea acestui proces vizînd fie toate izotipurile, fie numai unul singur, sau prin intensificarea lui exagerată, îmbrăcînd forme de supraproducţii.

Afecţiunile caracterizate prin reducerea sintezei imunoglobulinelor de tipul hipo- şi agammaglobulinemiilor, cînd sînt transmisibile ereditar, au de obicei la bază mutaţii germinative apărute pe cromozomul X. Cele netransmisibile sînt de regulă consecinţa mutaţiilor somatice. La om, au mai fost descrise sindroame de deficit imunologic rezultate din subdezvoltarea unuia sau a ambelor din cele 2 sisteme limfocitare: sistemul T în cazul aplaziei timice (sindromul Di George), sistemul B în cazul agammaglobulinemiei de tip Bruton şi ambele sisteme în cazul sindromului Wiskott-Aldrich.

Stările imunopatologice datorite intensificării exagerate a producţiei de efectori imuni se manifestă fie prin proliferarea anormală a celulelor anticorpoformatoare (boli imunoproliferative), fie prin supraproducţia de imunoglobuline complete sau incomplete.

În prima categorie de afecţiuni se încadrează mieloamele întîlnite la diferite specii, generate de proliferarea malignă a limfocitelor B şi tumorile plasmocitare ale şoarecelui.

Caracteristică pentru aceste stări patologice este apariţia „paraproteinelor", o categorie de imunoglobuline foarte pure, absente la indivizi normali.

În cazul supraproducţiei de imunoglobuline, în unele afecţiuni acestea sînt sintetizate sub forma lor completă, iar creşterea lor cantitativă poate implica toate clasele (gamapatii policlonale) sau numai o singură clasă (gamapatii monoclonale).

În alte afecţiuni are loc o supraproducţie de imunoglobuline incomplete, sintetizîndu-se în exces fie lanţuri H, fie lanţuri L. Acestea din urmă

Scanned with OKEN Scanner

traversează filtrul renal şi sînt evidenţiabile în urină, fiind desemnate şi sub denumirea de „proteine Bence-Jones".

Mecanismul genetic al stărilor imunopatologice caracterizate prin supraproducţia efectorilor imuni rezidă tot în procese mutative în cele mai multe cazuri somatice. Acestea apar de obicei pe fondul unei predispoziţii create prin mutaţii germinative.

Transmiterea ereditară a unor gamapatii indică însă intervenţia fără echivoc a unor alterări genetice localizate la nivelul autozomilor (după Seligman, 1966 citat de Pozgy şi Ghyka, 1974).

Determinismul genetic al fenomenelor de autoagresiune. Pornind de la premisa acceptării teoriei selecţiei clonale a lui Burnet, se admite că fiecare structură self care-şi manifestă proprietăţile antigenice în cazul inocularii la un individ dintr-o altă specie, sau chiar din aceeaşi specie, nu este antigenică pentru acel organism, datorită anihilării clonei capabile să producă efectori imuni faţă de selful respectiv şi transformării ei într-o „clonă interzisă".

Declanşarea unui răspuns imun faţă de compuşi self va fi prin urmare determinată de o reactivare a clonelor interzise, care redobîndesc capacitatea de a fi stimulate antigenic şi de a reacţiona prin elaborarea de efectori imuni.

Reactivarea clonelor interzise este rezultatul unor mutaţii somatice situate pe cromozomul X, care pot fi spontane sau dirijate. Iradierile pot constitui factori inductori pentru astfel de mutaţii. Ele se produc însă de obicei pe fondul unor predispoziţii constituţionale multifactoriale, care implică specia, linia, sexul şi vîrsta.

Reacţia speciilor animale la anticorpii antiţesut este destul de diferită. Astfel, în ce priveşte sensibilitatea faţă de efectorii imuni antiţesut renal, manifestată în patogeneza nefropatiilor autoimune, se constată un remarcabil grad de sensibilitate la oaie, rezistenţă la şoareci şi o comportare intermediară între aceste două extreme la şobolan. În cadrul speciei, se constată diferenţe în funcţie de linia genetică. Astfel, rezistenţa caracteristică a şoarecilor faţă de nefrita autoimună se exprimă deplin la linia A/Jax, mai slab la linia AKR şi deloc la linia BALB/c care este foarte sensibilă. Linia de şoareci NZB s-a dovedit de asemenea foarte sensibilă atît la glomerulonefrite, cît şi la alte afecţiuni autoimune. Sensibilitatea liniei NZB s-a dovedit a fi determinată de prezenţa în genomul ei a unei alele mutante, codominantă cu cea normală, responsabilă de predispoziţia la producerea prin mutaţii somatice a alterărilor autoimune, predispoziţie transmisibilă ereditar.

În privinţa corelaţiei între frecvenţa bolilor autoimune şi sex s-a constatat o incidenţă mult mai mare a acestora la femei comparativ cu bărbatul. Explicaţia acestei diferenţe se datoreşte prezenţei la femei a cromozomului X, pe care se produc mutaţiile somatice responsabile de redeşteptarea clonelor interzise, în dublu exemplar.

Factorul vîrstă intervine în sensul existenţei unui paralelism între creşterea frecvenţei tulburărilor autoimune şi fenomenul de îmbătrînire. Este foarte probabil că la o vîrstă mai avansată evoluţia afecţiunilor autoimune să fie influenţată de alterări ale selfului direct prin dereglări genetice, ţinînd seama de faptul că producţia de efectori imuni anti-self ar putea să fie încetinită datorită epuizării clonelor imunoformatoare.

Interferenţa factorilor constituţionali în producerea afecţiunilor autoimune atestă rolul mutaţiilor somatice în reactivarea clonelor interzise produse pe fondul unor stări de predispoziţie, care la rîndul lor se creează după toate probabilităţile pe baza unor mutaţii germinative transmisibile ereditar.

Scanned with OKEN Scanner

X Teorii şi ipoteze asupra unor aspecte încă nedemonstrate experimental ale răspunsului imun

Cunoaşterea detaliată a procesului de imunogeneză nu a reuşit încă să lămurească definitiv toate aspectele mecanismelor de fineţe ale acestuia. Fenomenele imunologice care implică şi astăzi cele mai multe necunoscute sînt specificitatea extrem de riguroasă a efectorilor imuni faţă de antigenul care a determinat geneza lor şi memoria imunologică.

X. 1. Teorii generale privind modul în care atigenul determină elaborarea efectorilor imuni specifici

Ipotezele şi teoriile emise de-a lungul timpului, care au încercat să explice relaţia între stimulul antigenic şi producţia de efectori specifici pot fi împărţite în două categorii — teorii instructive şi selective.

Teoriile instructive atribuie antigenului rolul de model ce „instruieşte" celula imunocompetentă cu privire la modul de sinteză a imunoglobulinelor. Conform acestor teorii, celulele imunocompetente nu au o specializare predeterminată faţă de anumite antigene, rolul principal în determinismul specificităţii anticorpilor avîndu-l configuraţia moleculei de antigen.

Teoria matriţelor sau modelelor elaborată într-o primă formă de Pauling în 1940 şi dezvoltată apoi de Haurowitz în perioada 1953—1962 este cea mai reprezentativă dintre teoriile instructive. Ea pleacă de la premisa că prezenţa antigenului induce modificarea sintezei globulinelor normale în sensul schimbării configuraţiei lor stereochimice în anumite regiuni de la periferia moleculei. Aceste schimbări se manifestă în special prin apariţia situsurilor combinative pe suprafaţa moleculelor de globulină determinîndu-le calitatea de anticorpi. Situsurile se constituie însă pe baza modelului oferit de complementaritatea grupărilor chimice din situsul combinativ al antigenului. Acesta dă prin urmare indicaţii (instruieşte, informează) celula globulinoformatoare cu privire la modul în care aceasta trebuie sintetizată pentru a îndeplini funcţia de anticorp.

Conform teoriilor instructive, anticorpogeneza reprezintă un fenomen epigenetic, una şi aceeaşi celulă avînd posibilitatea să-şi adapteze activita-

tea biosintetică producţiei de anticorpi cu specificităţi diferite în funcţie de diferitele antigene care vin s-o instruiască.

Principalul argument care pledează astăzi împotriva teoriilor instructive constă în faptul că o imunizare concomitentă cu două antigene diferite determină elaborarea de anticorpi faţă de ambele antigene, dar de către celule diferite, o celulă sintetizînd anticorpi numai faţă de un singur antigen. De aceea, teoriile instructive şi-au pierdut în ultimii ani din actualitate, menţinerea lor marcînd stadiul cunoştinţelor de imunologie într-o etapă a dezvoltării ei care este pe cale de a fi depăşită.

Teoriile selective pornesc de la ipoteza predeterminării genetice a liniilor celulare imunocompetente pentru toate antigenele existente în natură pentru o specie biologică dată. Antigenului îi revine rolul de selector al liniei celulare capabile să sintetizeze anticorpi specifici numai lui, celelalte linii fiind destinate altor antigene.

Teoria selecţiei clonale, emisă de Burnet (1959), a fost teoria selectivă care s-a bucurat de cel mai mult credit în timpul ultimelor decenii. Ea pleacă de la premisa unipotenţei celulelor imunocompetente pentru diferitele antigene existente în natură, însuşiri la care acestea ajung printr-un proces de selecţie şi specializare, care are loc pe parcursul procesului de citodiferenţiere din organele limfoide primare din perioada dezvoltării embrionare a organismului. Numărul antigenelor pentru o specie biologică capabilă de răspuns imun este de ordinul 10^5. În organele limfoide primare, se formează deci 10^5 clone sau linii celulare specializate fiecare în parte pentru cîte un antigen. Celulele cap de clonă, în momentul maturării imunologice, sînt distribuite în organele limfoide secundare unde rămîn într-o fază dormantă pînă în momentul pătrunderii antigenului în organism. Antigenul va selecta şi va activa numai clona care îi este specifică. Conform acestei teorii, organismul nu formează efectori imuni faţă de constituenţii lui proprii, datorită faptului că în timpul dezvoltării embrionare, cantitatea mare de compuşi proprii determină o paralizie (o anihilare) a clonelor, care ar urma să se specializeze pentru compuşii proprii, acestea transformîndu-se în clone interzise.

În faza embrionară a dezvoltării ontogenetice se produc prin urmare două procese în următoarea succesiune: a) iniţierea diversificării celulelor multipotenţiale (committment) în sensul specializării pe antigene şi a transformării lor în celule unipotenţiale, în mod nediscriminatoriu şi b) transformarea clonelor capabile de a produce efectori imuni faţă de self în clone interzise prin anihilarea lor funcţională.

Olinescu (1975) cercetînd ontogenia imunoglobulinelor la şoarece constată că celule apte să răspundă la stimuli antigenici sînt prezente şi la embrioni, dar capacitatea lor reactivă, în comparaţie cu celulele animalului adult, este mult mai redusă.

Burnet şi Mackay (1962) atribuie anihilarea (interzicerea) clonelor specifice selfului existenţei unui cod de autorecunoaştere funcţional în perioada prenatală situat în timus.

Teoria selecţiei clonale a lui Burnet a fost adoptată într-un timp relativ scurt de majoritatea imunologilor, întrucît ea oferă argumente valabile pentru explicarea următoarelor fenomene şi mecanisme:

— răspunsul secundar (reacţia anamnestică), a cărui intensitate şi viteză de producere mai mare se justifică prin fenomenele care au avut loc în cadrul răspunsului primar şi anume: trezirea celulei cap de clonă specializată pentru antigenul respectiv şi proliferarea ei (expansiunea clonală); de aceea, la reinocularea antigenului (rapel), datorită prezenţei unui număr mult mai mare de celule specializate pentru antigenul respectiv, organis-

Scanned with OKEN Scanner

mul este capabil de un răspuns mai prompt şi mai intens;

— toleranţa imunologică, în care incapacitatea organismului de a reacţiona printr-un răspuns imun îşi găseşte explicaţia în anihilarea clonei destinate antigenului tolerogen, printr-un mecanism identic cu cel suferit de clonele care în primele stadii ale dezvoltării ontogenetice aveau capacitatea potenţială să evolueze către imunocompetenţa fără de self. Antigenul tolerogen este asimilat ca self, iar clona care-i fusese destinată fiind interzisă, el devine incapabil să mai declanşeze un răspuns imun, datorită faptului că antigenul respectiv este inclus în codul de autorecunoaştere al organismului. Aşa se explică inducerea toleranţei în urma pătrunderii accidentale sau a introducerii experimentale a unui antigen la un organism în perioada dezvoltării sale embrionare. Pe astfel de căi iau naştere himerele, organisme care includ elemente structurale specifice altor indivizi, ca de exemplu viţeii gemeni heterozigoţi care posedă antigene de grup sanguin diferite, consecutiv contactelor realizate în cursul circulaţiei placentare.

Teoria selecţiei sub forma în care a fost emisă de B u r n e t nu reuşeşte însă să explice toate faţetele fenomenelor implicate în răspunsul imun. Aşa de exemplu, ea nu explică în suficientă măsură modul în care clonele se specializează faţă de toate antigenele existente în natură în condiţiile absenţei acestora din organism, nu elucidează toate detaliile specificităţii imunologice şi nici ale memoriei imunologice. Această stare de lucruri a generat emiterea ulterioară a altor teorii imunologice, unele cu caracter general, menite în principiu să pună de acord teoria lui Burnet cu datele noi din ce în ce mai multe şi mai complexe, mai ales a celor din domeniul imunochimiei şi imunogeneticii, altele cu caracter de ipoteze care încearcă să explice una sau alta din multiplele particularităţi implicate în răspunsul imun.

Teoria selecţiei accelerate emisă de J e r n e (1971) completează teoria lui Burnet şi încearcă să explice substratul genetic al constituirii şi specializării clonelor, admiţînd posibilitatea diversificării lor prin procese mutative, care au loc în cursul proceselor de maturare şi citodiferenţiere. Acestea implică cele două categorii de gene V şi C care codifică sinteza regiunilor variabile, respectiv constante ale lanţurilor L şi H. În genomul liniei germinative a fiecărei clone sînt prezente un număr mic de gene structurale V, care determină configuraţia chimică a regiunilor variabile, inclusiv a situsului combinativ al anticorpilor specifici antigenelor de histocompatibilitate. În cursul diviziunii rapide a clonelor la nivelul timusului, se produc mutaţii, diversificîndu-se celulele cap de clonă a căror genă V codifică anticorpi cu specificitate de antigen diferită. Celulele care suferă mutaţia devin cap de clonă pentru diferitele antigene existente în natură, în timp ce celulele care nu suferă mutaţia genelor V vor reprezenta clonele interzise, care potenţial ar putea codifica sinteza anticorpilor faţă de compuşii proprii.

Constituirea tuturor clonelor capabile de un răspuns imun faţă de non self, luînd în calcul întreaga diversitate a imunoglobulinelor s-ar putea realiza admiţînd o rată de mutaţie de 10^{-5}, 1 diviziune celulară.

X. 2. Ipoteze şi încercări de explicare a unor particularităţi caracteristice fenomenelor imunologice

Ipoteze privind realizarea determinismului monogenic al regiunilor C-V. Sinteza regiunilor V şi C ale lanţurilor polipeptidice ale imunoglobulinelor sub codificarea unui fragment continuu de ADN tradusă la nivelul poliribozo-

Scanned with OKEN Scanner

milor printr-un singur lanț de ARN^m este un fapt bine stabilit. Aspectul paradoxal al fenomenului care face simțită nevoia unei explicații logice constă în asamblarea în aceeași unitate genetică a unei zone extrem de instabile — V cu una de o remarcabilă stabilitate — C.

Ipoteza translocării susține originea diferită în cursul filogenezei și ontogenezei a celor două categorii de gene. Într-o anumită etapă a dezvoltării, genele V se rup probabil de pe cromozomul pe care se găsesc și se transferă pe alt cromozom, inserîndu-se la extremitatea genelor C, rezultînd genele complete VC. Acest tip de translocare are loc în dublu exemplar în fiecare celulă imunocompetentă, producîndu-se separat pentru perechea de gene $V_H - C_H$ și separat pentru perechile $V_L - C_L$. Condiția acestor combinări de gene, pentru a face în final posibilă codificarea unei imunoglobuline specifice pentru un antigen dat, este alăturarea genelor V_L de genele C_L și V_H de C_H în așa fel încît și combinația între genele V_L și V_H să concure la codificarea aceleiași specificități de antigen. Ipoteza translocării implică admiterea codificării unui singur lanț polipeptidic sub controlul a doi cistroni. Fenomenele care-și găsesc o argumentare convingătoare prin ipoteza translocării sînt stabilitatea specificității pentru un antigen dat a unei anumite clone pe de o parte și faptul că toate celulele rezultate în urma expansiunii clonale a acesteia vor produce anticorpi identici din punct de vedere izo- și alotipic pe de altă parte. Ipoteza translocării nu oferă încă o explicație satisfăcătoare prezenței în aceeași celulă a unui număr mare de gene V diferite.

Ipoteze privind determinismul diversificării genelor V. Marea variabilitate a genelor V în cadrul genomului aceleiași celule imunocompetente s-a încercat să fie explicată pe baza a trei ipoteze: ipoteza germinativă, ipoteza hipermutabilității somatice și ipoteza recombinărilor somatice.

Ipoteza germinativă (H o o d și T a l m a g e) admite faptul că fiecare genă C, pentru a da naștere unei gene complete VC, poate intra în combinație cu un număr foarte mare de gene V (aproximativ 10 000). Ținînd seama de faptul că la formarea fiecărei imunoglobuline participă atît lanțuri H, cît și lanțuri L, numărul genelor V va fi prin urmare dublu, deci în jur de 20 000. Mărimea acestei cifre, privită în contextul raportului dintre cantitatea de ADN total și ansamblul sintezelor codificate într-o celulă, apare însă ca neverosimilă. În fața acestui raționament care pledează împotriva ipotezei germinative, adepții acesteia încearcă să contraargumenteze admițînd posibilitatea expansiunii și restrîngerii rapide a unor gene pe parcursul dezvoltării, în concordanță cu numărul de subgrupe de variabilitate diferit de la o specie la alta. Modelul „expansiune- restrîngere" este însă la rîndul lui contrazis de unele fenomene imunologice cum este existența homozigoților pentru specificitățile alotipice, care infirmă posibilitatea recombinării genelor care le codifică.

Un alt fapt care ar pleda împotriva unui control multigenic al sintezei regiunilor V constă în compoziția asemănătoare în aminoacizi a acestora la specii diferite. F o u g e r e a u (1974) remarcă aproximativ același grad de similitudine între compoziția regiunii C a unor lanțuri grele ale unor imunoglobuline de șoarece, om și iepure și cea existentă între regiunile V aferente.

Ansamblul acestor contraargumente conferă ipotezei germinative un grad redus de valabilitate, cu toate că ea oferă avantajul de a exclude intervenția unor mecanisme „ad hoc" în sinteza imunoglobulinelor.

Ipoteza hipermutabilității somatice atribuie variabilitatea anticorpilor mutațiilor intragenice care se produc la nivelul genelor V. Ea este cea mai veche în ordine cronologică și admite un

Scanned with OKEN Scanner

număr foarte mare de mutații care se produc în cursul constituirii clonelor.

Unele mutații, numite și neadecvate, vor duce la determinismul unor lanțuri polipeptidice care nu vor putea participa la formarea globulinelor anticorp, spre deosebire de cele adecvate care vor avea drept consecință apariția capacității sintezei lanțurilor componente ale diferiților anticorpi.

Ipoteza hipermutabilității se lovește astăzi de numeroase contraargumente ca: existența unor secvențe relativ constante de aminoacizi, chiar în regiunile hipervariabile ale lanțurilor L și H, dificultatea găsirii unei explicații pentru faptul că mutațiile afectează într-o măsură așa de mare numai o anumită zonă din gena completă VC; necesitatea admiterii unei rate de mutație nerevorisimil de mari pentru a acoperi determinismul tuturor variantelor de situs combinativ pentru antigenele existente în natură, plus mutațiile neadecvate.

Ipotezele mutațiilor și recombinărilor somatice (M i l s t e i n, C o h n) exclud existența unui număr diferit de gene V față de cel al genelor C, numărul celor două categorii de gene fiind identic. Ipoteza mutațiilor somatice admite producerea acestora în cursul dezvoltării ontogenetice, fără ca ele să fie înscrise în linia germinativă, consecința lor fiind variabilitatea caracteristică imunoglobulinelor. Aceste mutații au, după C o h n (1971), un caracter selectiv, rolul de selector revenind antigenului. O explicație logică a mecanismului după care se produc aceste mutații o oferă teoria selecției accelerate a lui J e r n e deja descrisă.

Ipoteza recombinărilor somatice pleacă de la premisa că acestea se produc intracromozomal în celulele liniilor somatice. Cu privire la mecanismul lor au fost emise mai multe modele:

a) modelul lui B r e n n e r și M i l s t e i n admite faptul că într-un anumit moment al ontogenezei, ADN care codifică sinteza imunoglobulinelor se fragmentează sub acțiunea biocatalitică a unor nucleaze, fiecare fragment reprezentînd o genă V. Fragmentele respective se deplasează, atașîndu-se prin acțiunea unor lipaze de segmentele de ADN constituente ale genelor C, rezultînd în final genele complete VC. Acest model prezintă numeroase asemănări cu ipoteza translocării, de care se deosebește prin faptul că acceptă numai pentru genele V posibilitatea deplasării, genele C avînd o poziție stabilă pe cromozom;

b) modelul lui S m i t h i e s presupune producerea recombinărilor în timpul diviziunilor mitotice, cînd cromozomii pot descrie diferite ondulațiuni, producîndu-se contacte (sinapse) între zone diferite ale aceluiași cromozom. Realizarea unei recombinări este condiționată de sinapsa între două tipuri de gene nonalelice de calități diferite: una completă V—C, numită și „master gene" și una incompletă V, numită și „scrambler gene". Grefarea genelor incomplete V pe genele complete V—C reprezintă, conform acestei concepții, baza genetică a variabilității anticorpilor.

Unii imunologi au preconizat modele mixte care presupun producerea recombinărilor, ca mecanism preponderent, pe fondul preexistent al unui număr limitat de mutații;

c) modelul lui G a l l y și E d e l m a n (1970) este reprezentativ pentru această concepție; el are la bază premisa existenței unui număr determinat de cistroni V pentru fiecare subgrupă, evaluat la aproximativ 50. Una sau alta din genele V, trecînd printr-o fază asemănătoare cu epizomii cunoscuți la bacterii, se va transloca în regiunea C, rezultînd gena completă V—C;

d) modelul lui K a b a t concepe existența unei rezerve (depozit stoc) de gene de hipervariabilitate sub forma unor miniepizomi translocabili pe genele C în funcție de specificitatea imunoglobulinei.

Cu toate că nici una din diferitele ipoteze și modele privind explicarea

Scanned with OKEN Scanner

variabilităţii anticorpilor nu este pe deplin demonstrată, faptele experimentale, printre care mai convingătoare trebuie considerate experienţele executate cu hibrizii ADN/ARN marcaţi cu izotopi radioactivi, atestă existenţa unui număr relativ redus de gene C şi V, diversitatea imunoglobulinelor avînd prin urmare cel puţin în majoritatea cazurilor o origine somatică.

X. 3. Încercări de explicare a memoriei imunologice

Teoria selecţiei clonale a lui Burnet prin expansiunea clonală produsă la răspunsul primar oferă parţial o explicaţie mecanismelor de memorie.

Teoria transcripţiei metabolice încearcă să lămurească mecanismul memoriei bazată pe importanta descoperire a lui Temin şi Mizutani (1970) a posibilităţii de transcriere inversă a informaţiei genetice de pe ARN pe ADN prin transcriptaze inverse (ADN-polimeraze ARN-dependente) la unele virusuri. Extrapolînd acest mecanism la limfocitele de memorie poate fi admisă transcrierea inversă a informaţiei antigenice constituită din complexul antigen-ARN, preluată de limfocit de la macrofag, în genomul celulei imunocompetente. În mecanismul ei intervine probabil un ARN special, sintetizat, capabil de captarea informaţiei privind configuraţia chimică a situsurilor antigenice pe ADN din genomul limfocitului. Astfel, informaţia antigenică înscrisă în genom este transformată în informaţie genetică şi va putea fi oricînd exprimată fenotipic în producerea efectorilor imuni prin intermediul acţiunii limfocitelor de memorie.

Scanned with OKEN Scanner

XI Fenomenele de hipersensibilizare

XI. 1. Definiţii. Clasificări

Noţiunea de hipersensibilizare (alergie, sensibilizare) include un grup de procese imune caracterizate prin modificarea semnificativă a modului în care un organism răspunde faţă de un antigen cu care a realizat anterior un contact. În urma acestei sensibilizări prealabile, o nouă introducere a antigenului determină reacţii antigen-anticorp care se desfăşoară *in vivo* şi leziuni de diferite intensităţi, locale sau cu răsunet general.

În funcţie de căile prin care sînt induse şi ulterior declanşate, de natura antigenului, de manifestările morfoclinice ale răspunsurilor şi în special de mecanismele implicate, fenomenele de hipersensibilizare sînt grupate astfel:

— hipersensibilizări de tip imediat — anafilaxia, citoliza alergică, fenomenul de tip Arthus;

— hipersensibilizări de tip tardiv;

— hipersensibilizări „nespecifice" de tip Sanarelli-Schwartzmann.

Clasificarea propusă de G e l l şi C o o m b s (1968) include patru tipuri de reacţii de hipersensibilizare:

1. anafilaxia şi atopia
2. reacţii citolitice şi citotoxice
3. fenomenul Arthus, boala serului, sindromul de complexe antigen-anticorp
4. reacţiile mediate celular, de tip tuberculinic.

După G r a y (1964), pot fi recunoscute:

— reacţii alergice imediate (umorale), induse cu participarea anticorpilor;

— reacţii alergice imediate (umorale), spontane, cu participarea reaginelor;

— reacţii alergice întîrziate (celulare), cu participarea celulelor mononucleare, incluzînd fenomene de natură infecţioasă, cu origine neinfecţioasă, imunitatea de transplantare şi boli autoimune.

Analizînd problema clasificării stărilor de hipersensibilizare, P a t t e r s o n şi col. (1976) arată că, faţă de sistemul G e l l şi C o o m b s, au fost propuse tipuri noi: reacţia cu anticorpi contra celulelor tiroidei şi reacţia de citotoxicitate celulară dependentă de anticorpi.

Fenomenele de hipersensibilizare fac parte dintre procesele imunologice, fapt demonstrat prin inducerea lor de către substanţele chimice avînd un grad minim de complexitate, prin participarea la realizare a anticorpilor sau a celulelor sensibilizate şi prin exteriorizarea condiţionată de prezenţa antigenului declanşator.

Scanned with OKEN Scanner

Această grupă de reacţii imunologice prezintă un interes deosebit în patologie. O serie de afecţiuni recunosc ca substrat etiopatogenetic mecanisme de tip alergic; în evoluţia unor boli cu etiologie microbiană sau parazitară participă componente induse prin procese de hipersensibilizare; în sfîrşit, prezenţa restructurărilor specifice în hipersensibilizările mediate celular asigură stabilirea diagnosticului prin aplicarea unor metode, *in vivo* sau *in vitro*. Rezultă deci că fenomenele de hipersensibilizare sînt, în majoritate, nocive; ele pot fi implicate în evoluţia unor stări patologice deosebit de grave, a căror prevenire şi al căror tratament sînt dificile.

XI. 2. Hipersensibilizarea de tip imediat

XI. 2.1. Anafilaxia

Reproducerea în condiţii experimentale a fenomenului de anafilaxie poate explica, în bună măsură, mecanismul prin care acesta este realizat. Astfel, la cobai se inoculează un antigen proteic care este suportat de animal fără a prezenta, în nici un fel, modificări morfo-clinice. În cazul reinoculării aceluiaşi antigen pe cale intravenoasă, după un interval de 10—15 zile, animalul manifestă simptome grave şi moare prin asfixie, în cîteva minute.

Fenomenul de anafilaxie (consemnînd fenomenul de absenţă a apărării faţă de un antigen străin) a fost semnalat de Portier şi Richet (1901) care au constatat că în urma inoculării unor extracte de celenterate nu se realizează o stare de protecţie ci, dimpotrivă, o sensibilizare crescută.

Fenomenele anafilactice sînt manifestări ale unor mecanisme patogenetice imune, fapt demonstrat în primul rînd prin necesitatea ca injecţia declanşatoare să fie efectuată cu acelaşi antigen sau cu un altul, înrudit însă antigenic cu primul. Între cele două administrări ale antigenului este necesar să existe un timp de latenţă de 8—10 zile, perioadă în care informaţia primită este „asimilată" şi conduce la biosinteza imunoglobulinelor specifice. Antigenul sensibilizant poate fi reprezentat de o mare varietate de compuşi, inclusiv de haptene; acţiunea lor este realizată fără să fie necesară folosirea unui adjuvant. Suportul proteic component al antigenului nu are specificitate în cazul reacţiilor anafilactice.

Principalul element care intervine în mecanismul reacţiilor anafilactice este reprezentat de anticorpii serici fixaţi pe anumite celule ca mastocitele, bazofilele şi macrofagele; în urma inocularii celei de a doua doze de antigen (doza declanşatoare a reacţiei anafilactice) se realizează cuplarea antigen-anticorp la nivelul suprafeţelor celulelor care, la rîndul lor, eliberează anumite substanţe implicate în producerea modificărilor caracteristice (leziuni şi simptome) (fig. 20).

Participarea anticorpilor la procese de acest fel este demonstrată şi de faptul că ele nu pot fi reproduse la organisme cu agammaglobulinemie.

Se admite în prezent că principalele imunoglobuline care participă la fenomenele anafilactice fac parte din clasele IgE şi IgG; aceasta din urmă se fixează mai puţin intens la receptorii de membrană ai celulelor şi au un rol evident mai puţin important decît IgE.

Complementul nu este implicat în procesele imunologice anafilactice.

Substanţele active care intervin în patogeneza diverselor stări de hipersensibilizare sînt:

— *histamina*, prezentă în granulele mastocitelor şi ale leucocitelor bazofile; distrugerea acestor celule sau expulzarea granulelor determină eliberarea histaminei. Substanţa este for-

Scanned with OKEN Scanner

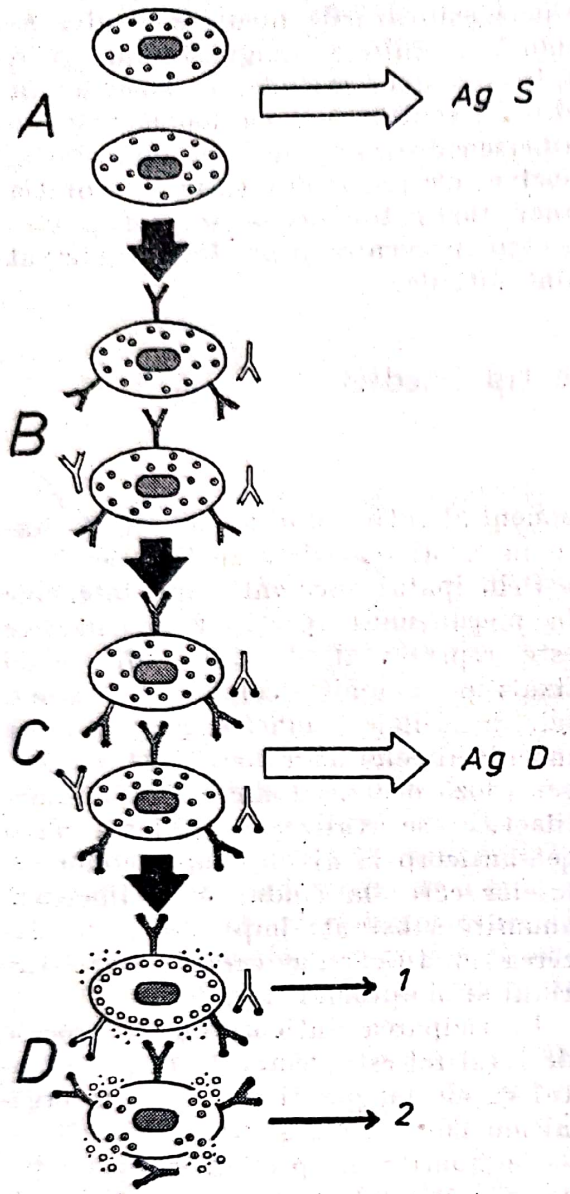


Fig. 20 — Reprezentarea schematică a modului de realizare a fenomenului de anafilaxie

A — inocularea antigenului sensibilizant (*AgS*); *B* — fixarea anticorpilor la mastocite; *C* — inocularea antigenului declanşator (*AgD*) şi reacţia dintre antigen şi moleculele de anticorpi; *D* — eliberarea histaminei din celule (*1*) sau a granulelor şi ulterior a histaminei (*2*)

mată îndeosebi în ţesuturile în care fenomenul de proliferare decurge intens şi rapid, cum este cazul fetusului şi al ţesuturilor implicate într-un proces inflamator. Holroyde şi Eyre (1976) au constatat că la bovine histamina este eliberată de leucocite în urma contactului cu antigenul specific. Bruka şi col. (1976) au făcut constatări similare la cal. Spre deosebire de alte specii, adrenalina intensifică acest proces. Produce contracţia intensă şi rapidă a musculaturii netede, măreşte permeabilitatea vaselor şi determină dilatarea capilarelor; simptome asemănătoare şocului anafilactic sînt produse prin inocularea histaminei la animale normale;

— *heparina*, eliberată din mastocite, concomitent cu histamina, are activitate anticoagulantă;

— *serotonina* (*5-hidroxitriptamina*) prezentă în diferite concentraţii, în plăcuţele sanguine şi mastocite, contribuie la reacţiile de hipersensibilizare prin aceleaşi efecte ca şi histamina;

— *bradikinina*, substanţă care rezultă în urma transformării kininogenului din plasma sanguină, modificare de structură care este mediată enzimatic; are o acţiune lentă, determinînd vasodilataţie, creşterea permeabilităţii pereţilor vasculari şi contracţia muşchilor netezi — în special de la nivelul bronhiolelor;

— *substanţa lent reactivă a anafilaxiei* (*SRS-A*), probabil un grup de substanţe lipoproteice cu acţiune similară, insuficient analizată pînă în prezent; produce congestia intensă şi lezionarea vaselor capilare intestinale; acţionînd foarte lent, determină contracţia muşchilor netezi; activitatea sa nu este inhibată de substanţele antihistaminice;

— *factorul de permeabilitate a ganglionilor limfatici*, prezent în leucocitele mononucleare; este de natură proteică; intervine în reacţiile de hipersensibilitate de tip tardiv, caracterizate prin infiltraţii leucocitare; produce creşterea permeabilităţii vaselor sanguine şi infiltraţii limfocitare, precum şi uşoare contracţii musculare.

În afara acestor substanţe au mai fost descrise: factorul chimiotactic eozinofilic al anafilaxiei (ECF-A) şi factorul de activare a trombocitelor (PAF). Histamina şi ECF-A sînt mediatori preexistenţi în celule în timp ce SRS-A şi PAF sînt formate şi eliberate ca re-

zultat direct al reacţiilor de hipersensibilizare imediată (A u s t e n şi col., 1974).

Eliberarea histaminei din celule decurge în urma realizării reacţiei antigen-anticorp la suprafaţa celulelor respective, într-un timp relativ scurt, de 5—10 minute.

Transferul pasiv al sensibilizării anafilactice se obţine prin inocularea la animalul primitor a serului (deci a anticorpilor) de la animalul donator sensibilizat. Transferul nu se realizează cu celule imune. Durata sensibilizării transmise pasiv este de 1—3 săptămîni, deci similară cu durata protecţiei conferite de serurile hiperimune profilactice.

În urma repetării contactului cu antigenul sensibilizant, în funcţie de calea de inoculare a acestuia, rezultă manifestări diferite ale hipersensibilizării anafilactice.

Anafilaxia activă generală. În cazul inocularii dozei declanşatoare a antigenului pe cale intravenoasă, se produce complexul de simptome cunoscut ca *anafilaxie sistemică* sau *generală* (fig. 21); este tot atît de răspîndită noţiunea de *şoc anafilactic*. Fenomenele patologice caracteristice sînt dramatice, spasm bronşic, edem laringian, scăderea tensiunii sanguine, urticarie intensă, ulterior erupţii cutanate, adenopatii, edeme, febră (la om), nelinişte, respiraţie dificilă, convulsii, relaxarea sfincterelor, cianoză, asfixie (cobai), stare gravă de şoc prin acumularea celei mai mari părţi din masa sanguină în ficat (cîine). Principalele elemente patogenetice sînt constituite de blocarea muşchilor netezi şi de colapsul circulator.

W r a y şi T h o m l i n s o n (1974) nu au pus în evidenţă eliberarea de histamină în plasma sanguină la viţeii la care s-a reprodus fenomenul de ana-

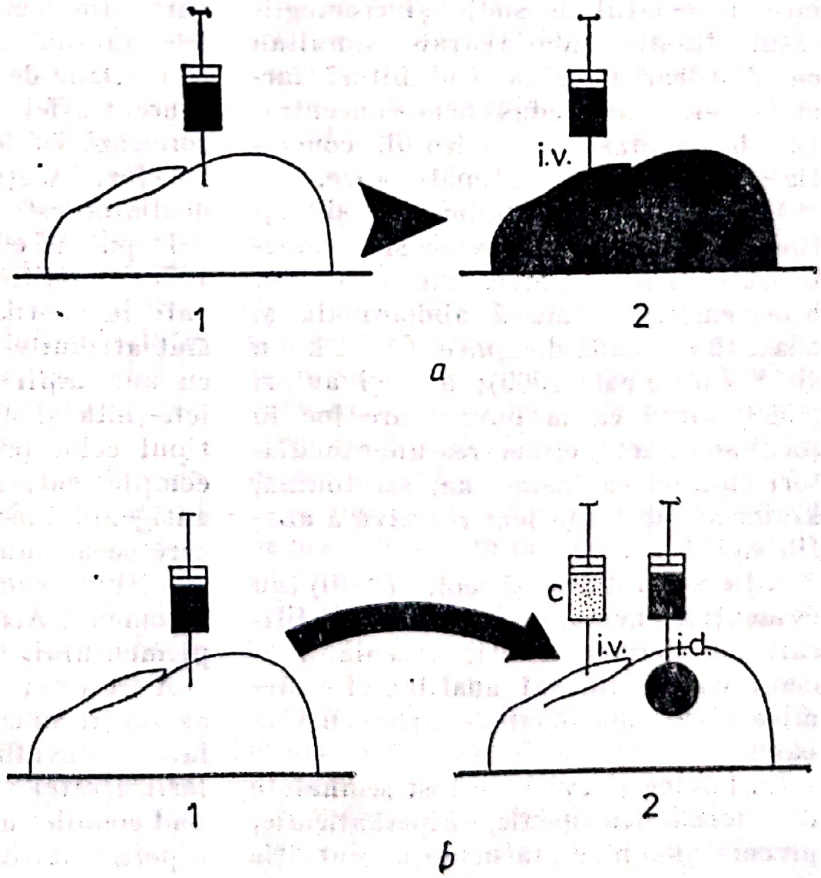


Fig. 21 — Reprezentarea schematică a fenomenului de anafilaxie activă generală (a) şi de anafilaxie activă locală (b)

filaxie activă generală. Autorii au reprodus simptomele şi leziunile caracteristice şocului anafilactic prin inocularea histaminei şi a 5-hidroxitriptaminei. Pe baza datelor obţinute, ei afirmă că în declanşarea simptomelor de şoc anafilactic acut acţionează sinergic mai multe substanţe active, chiar dacă fiecare dintre acestea este prezentă în concentraţii reduse.

Medicamentele antagoniste folosite de autori nu au protejat viţeii faţă de sindromul de şoc anafilactic indus experimental.

Wells şi col. (1973) descriu un sindrom de anafilaxie sistemică acută la viţei sensibilizaţi cu ser de cal emulsificat în adjuvant Freund complet (pe cale subcutanată) şi ser de cal (pe cale intravenoasă). Sindromul se manifestă prin edem pulmonar, congestia ficatului, intestinului, splinei şi rinichiului. În pulmon a fost decelată o intensă infiltraţie cu leucocite polimorfonucleare. Medicamentele antihistaminice nu au protejat animalele, în schimb meclofenamatul de sodiu şi cromoglicatul disodic, administrate simultan cu dietilcarbamazina (inhibitori farmacologici) au redus hemoconcentraţia, hiperpotasiemia, edemul, congestia şi modificările histopatologice.

Modificările cardiopulmonare şi anafilaxia sistemică la bovine sînt caracterizate prin hipotensiune arterială, hipertensiune venoasă abdominală şi o scurtă perioadă de apnee (Aitken şi Sanford 1969); aceiaşi autori (1969) arată că la bovine are loc în şocul anafilactic eliberarea unor mediatori chimici ca histamina, serotonina, kinine şi substanţa lent reactivă a anafilaxiei.

Alexander şi col. (1970) au evidenţiat hemoconcentraţie, modificări ale permeabilităţii vasculare, edem, ca rezultat al anafilaxiei sistemice şi al inocularii de histamină la oaie.

La bovine şi ovine au fost semnalate o intensă leucopenie, hiperkaliemie, precum şi o marcată hemoconcentraţie (Aitken şi Sanford, 1972), Wells şi col. 1973). Hemoconcentraţia este datorată creşterii permeabilităţii vasculare (ca urmare, se realizează o pierdere intensă de lichid circulator) ca şi contracţiei splenice, produsă de intensificarea activităţii componentei simpatice a sistemului nervos, avînd ca rezultat creşterea numărului de eritrocite circulante.

Creşterea potasiemiei la aceleaşi specii se explică prin trecerea ionilor de potasiu în sistemul vascular din muşchii netezi supuşi unor factori contractili şi din celulele-ţintă (mastocite, leucocite, trombocite) implicate în eliberarea de natură imunologică a substanţelor mediatoare anafilactogene.

Leucopenia este datorată trecerii leucocitelor în ţesuturi, fapt demonstrat prin infiltraţiile observate în cadrul examenului histopatologic al pulmonului de viţel la care a fost indus sindromul de anafilaxie sistemică. Prin similitudine cu anafilaxia descrisă la om, se afirmă că şi la rumegătoare o parte din leucocite (în special bazofilele) au rolul de celule mediatoare ţintă în reacţiile de tip anafilactic. Scăderea concentraţiei histaminei în sînge se corelează cu fenomenul de leucopenie, concluzie susţinută de faptul că acest mediator este purtat de bazofile.

După Wells şi Eyre (1970, 1972) modificările patologice observate în anafilaxia sistemică la bovine sînt atribuite interacţiunii antigenului cu anticorpii reaginici fixaţi la celulele-ţintă şi anticorpilor circulanţi de tipul celor precipitanţi şi fixatori de complement. Aceştia se pot cupla cu antigenul inoculat formînd complexe care se acumulează în vasele capilare, rezultînd reacţii similare cu cele din fenomenul Arthus cu participarea complementului.

Aitken şi Sanford (1974) au reuşit să sensibilizeze vaci de lapte faţă de ovalbumină. În cazul inocularii acestei proteine cu adjuvant Freund complet a fost evidenţiată prezenţa hipersensibilităţii cutanate cu ajutorul

Scanned with OKEN Scanner

testului de anafilaxie cutanată pasivă, ca şi a fenomenului de anafilaxie sistemică activă.

Starea de hipersensibilizare generală acută de tip imediat a fost descrisă şi la porc. Sindromul provocat s-a caracterizat prin depresiune generală accentuată, hipertensiune arterială pulmonară, dispnee şi apnee, evoluţia avînd un sfîrşit letal în 5—10 minute. Au fost constatate concentraţia mărită a histaminei, leucopenie şi trombocitopenie (Wells şi col., 1974). Reacţii de tip anafilactic la porc faţă de ovalbumină au realizat de asemenea Teige şi Nordstaga (1977). Inocularea antigenului declanşant a fost efectuată după două săptămîni de la injecţia sensibilizantă; ca urmare au apărut simptome caracteristice anafilaxiei şi edeme în mai multe organe interne, similare celor din boala edemelor. Aceste constatări aduc un argument în plus în susţinerea participării unei componente „alergice" în patogeneza acestei afecţiuni.

Anafilaxia activă locală. Spre deosebire de anafilaxia activă manifestată sistemic, la nivelul întregului organism, anafilaxia activă locală se traduce prin fenomene caracteristice care interesează un singur organ sau ţesut — cel în care se inoculează antigenul declanşator. Reacţia a fost realizată în condiţii experimentale, cu mai multe decenii în urmă, pe fragmente izolate de intestin menţinute într-o soluţie fiziologică; introducerea antigenului în soluţie era urmată de contracţii intense ale fragmentului de organ.

Fenomenul poate fi realizat prin inocularea intracutanată a antigenului declanşator la un individ sensibilizat, după inocularea pe cale intravenoasă a unui colorant. Declanşarea reacţiei antigen-anticorp este însoţită de fenomene vasculare produse în urma eliberării histaminei; ca urmare, la locul inocularii se acumulează colorantul extravazat împreună cu serul sanguin.

O stare de hipersensibilizare cutanată faţă de proteinele serice bovine a fost indusă la pisică, în special în cazul folosirii serului total şi a gammaglobulinelor totale (McCusker şi Aitken, 1969). Simptomele şi leziunile au avut caractere ale fenomenului de anafilaxie dar şi ale fenomenului de tip Arthus. Cu serul provenit de la pisici sensibilizate a fost reprodusă reacţia de anafilaxie cutanată pasivă inversă.

Anafilaxia pasivă generală. Este o variantă care se realizează prin transferul anticorpilor de la animalul sensibilizat, deci prin inocularea de ser sanguin lipsit de celule. Injecţia declanşatoare, reprezentată de antigenul care a indus sensibilizarea donatorului, este urmată de manifestări morfoclinice caracteristice anafilaxiei generale (fig. 22).

Realizarea fenomenului de anafilaxie pasivă generală depinde de respectarea unor factori importanţi:

— transferul anticorpilor la un primitor de aceeaşi specie, fapt care permite fixarea, în condiţii optime, a anticorpilor la celulele implicate în fenomenul de anafilaxie; este stabilit că receptorii de membrană ai acestor celule pot „accepta" numai Ig aparţinînd aceleiaşi specii de animal, eventual altor specii; există cuplări heteroloage donator-primitor care nu conduc la transferul de fapt al sensibilizării;

— trecerea unui timp de la inocularea serului pînă la injecţia declanşatoare suficient de mare pentru fixarea anticorpilor transferaţi la celulele primitorului; acest timp este de ordinul orelor — pînă la cîteva zile;

— inocularea unei doze suficient de mari de ser (în funcţie de titrul anticorpilor) care să asigure sensibilizarea celulelor implicate în realizarea fenomenului.

Fenomenul de anafilaxie pasivă generală poate fi declanşat un timp limitat după transferul serului de la donator.

Sensibilizarea pasivă a ţesuturilor. Reprezintă o variantă a fenomenului de

Scanned with OKEN Scanner

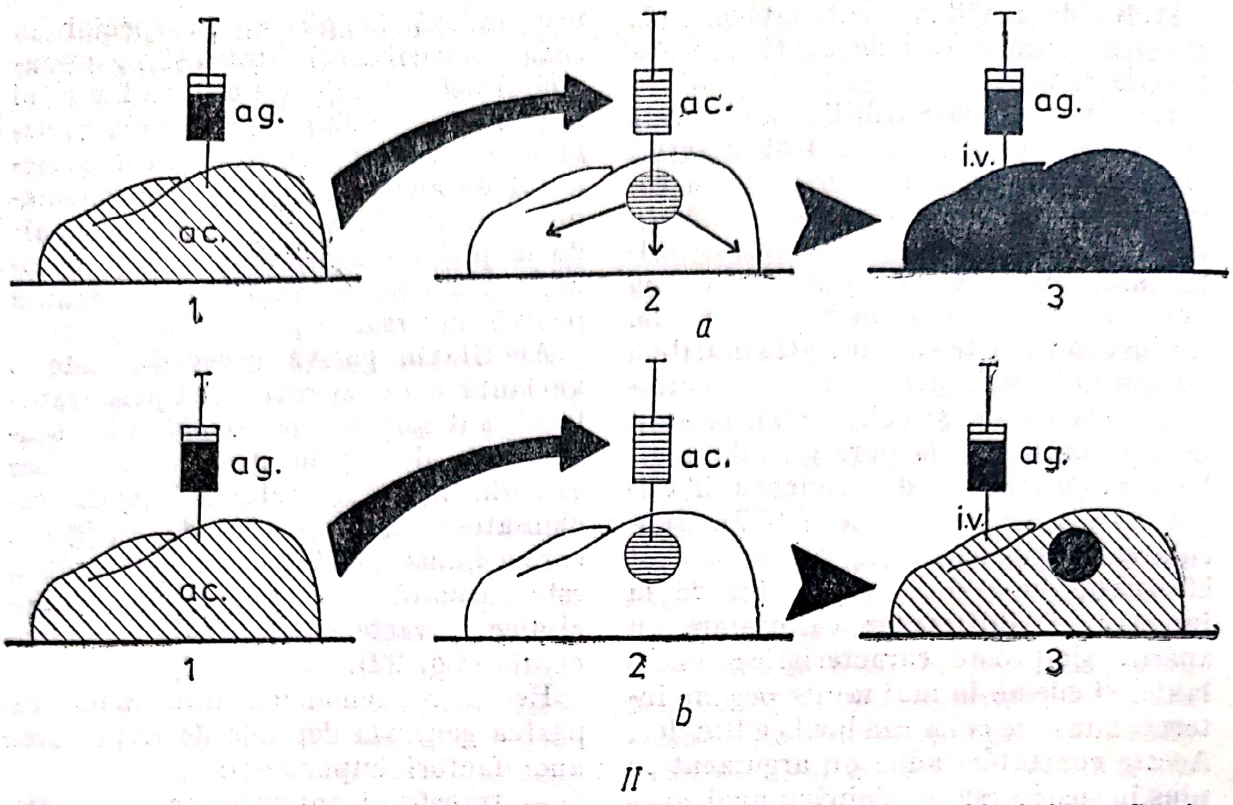


Fig. 22 — Reprezentarea schematică a testului de anafilaxie pasivă generală (a) şi de anafilaxie pasivă locală (b)

anafilaxie care este realizată în condiţii experimentale; poate fi folosită pentru testarea stărilor de sensibilizare, deci ca metodă de diagnostic. Experimentul celor doi pionieri în domeniu, Prausnitz şi Küstner, efectuat cu mulţi ani în urmă, este o demonstraţie a acestui fenomen. Sensibilizarea pasivă a ţesuturilor constituie în acelaşi timp o dovadă a posibilităţii de transmitere a stărilor de anafilaxie de la un donator sensibilizat la un primitor normal. Ca atare, reacţiile care vor fi prezentate în continuare demonstrează rolul anticorpilor umorali şi al fixării acestora la celulele efectoare în fenomenele de anafilaxie.

Metoda Prausnitz-Küstner se bazează pe reacţia dintre reaginele din serul unui donator sensibilizat şi antigenul inductor; fenomenul se realizează la un primitor. Serul donatorului sensibilizat se inoculează intradermic şi în continuare se administrează alergenul incriminat în inducerea sensibilizării. Dimensiunile reacţiei cutante locale (edem, eritem, pustulă) sînt în funcţie de concentraţia anticorpilor reaginici şi de aceea a alergenului folosit, desigur în prezenţa unor reacţii-martor negative: (1) alergen inoculat în absenţa serului şi (2) ser inoculat, cu administrarea de soluţie fiziologică în locul alergenului.

O serie de elemente condiţionează obţinerea unor rezultate corespunzătoare: respectarea unei perioade de 18—24 ore între inocularea serului şi a alergenului; alegerea primitorului; modul de efectuare; folosirea unui alergen standardizat.

Metoda Prausnitz-Küstner demonstrează sensibilitatea deosebită a pielii faţă de anticorpii-reagine care se fixează la mastocite şi, în urma reacţiei cu alergenul declanşator, determină eliberarea histaminei şi a altor mediatori, cu modificările care se produc în consecinţă.

Testul de anafilaxie cutanată pasivă se realizează pe baza reacţiei dintre anti-

corpii reaginici inoculaţi pe cale intradermică la un animal primitor şi alergenul sensibilizant inoculat pe cale intravenoasă împreună cu un colorant. În cîteva minute, la locul de inoculare apar în cazul reacţiei pozitive, semnele caracteristice declanşate de eliberarea histaminei şi a celorlalţi mediatori din mastocite.

Testul de anafilaxie pasivă cutanată se execută folosind, drept animale primitoare, cobaiul sau maimuţa. Este aplicat îndeosebi pentru diagnosticul unor stări alergice la om, fiind cunoscut şi sub denumirea „testul Ovary".

Metoda poate fi efectuată în urma inocularii pe cale intradermică a antigenului, urmată de administrarea pe cale intravenoasă a serului care conţine anticorpii reaginici („testul Ovary inversat"). În acest caz, antigenul este cel fixat de receptorii de membrană ai celulelor participante la realizarea fenomenului; ulterior, se declanşează reacţia antigen-reagine care determină suita de fenomene la nivelul celulelor care eliberează substanţele implicate în anafilaxie.

Mota şi col. (1969) au folosit testul de anafilaxie cutanată pasivă pentru demonstrarea prezenţei anticorpilor homocitotropi la cobaii infestaţi cu *Trichinella spiralis*. Metzger (1976) a aplicat acelaşi test pentru a studia sindromul de anafilaxie şi a evidenţia prezenţa anticorpilor reaginici din clasa IgE. Autorul a inoculat la porc, pe cale intradermică, serul care conţine IgE anti-lizozim. După 48 ore a inoculat antigenul omolog pe cale intravenoasă, împreună cu un colorant. După 2—20 minute, la locul inocularii serului s-a dezvoltat reacţia caracteristică. Acelaşi fenomen a fost demonstrat şi pe găină, folosind seruri recoltate de la păsări sensibilizate activ (Chand şi col., 1976).

Reproducerea fenomenului de anafilaxie pasivă poate fi obţinută şi *in vitro*, prin *testul de sensibilizare pasivă a intestinului* de cobai (Schultz-Dale). Se efectuează prin incubarea unor fragmente de intestin (provenite de la un animal sensibilizat, deci purtător de anticorpi reaginici) într-un mediu fiziologic în prezenţa anticorpilor. În continuare, fragmentele sînt trecute în altă soluţie fiziologică în prezenţa antigenului. Contractarea organului semnifică realizarea reacţiei antigen-anticorp; folosind drept parametri ai reacţiei (1) apariţia contractărilor şi intensitatea acestora precum şi (2) concentraţiile de anticorpi şi antigene folosite, se pot obţine indicii cantitative utile în studiul reacţiei în sine şi al reagenţilor participanţi.

Reacţiile de acelaşi tip au fost realizate folosindu-se răspunsul vaselor pulmonare în locul fragmentelor de intestin; metoda a fost aplicată la oaie (Eyre şi Deline, 1976) şi găină (Chand şi Eyre, 1976).

Au fost semnalate, fără a fi însă suficient studiate, cazuri spontane de anafilaxie pasivă realizată la purcei în urma transmiterii anticorpilor reaginici prin colostrul maternal. Acelaşi fenomen a fost constatat la viţei şi miei, prin transferul colostral al anticorpilor anafilactici, confirmat prin testele Prausnitz-Küstner şi de anafilaxie cutanată pasivă (Benten şi col, 1976).

XI.2.2. Fenomenul de citoliză alergică

Reacţiile citolitice se realizează prin participarea imunoglobulinelor şi a celulelor (prin antigenele de membrană ale acestora sau prin depozitarea la suprafaţa lor a unor complexe imune). Declanşarea reacţiei antigen-anticorp induce şi activarea tuturor componentelor complementului, avînd ca rezultat lezionarea gravă şi ireversibilă a membranelor celulelor-ţintă.

Scanned with OKEN Scanner

În această categorie de fenomene sînt incluse stări patologice prin izoimunizare maternală ca eritrocitoliza mînjilor, purceilor şi viţeilor, purpura tromocitopenică a purceilor. Mecanisme similare citolizei alergice sînt implicate în etiopatogenia unor boli autoimune şi a unor alergii medicamentoase. Exemple ale unor afecţiuni de această natură sînt: hipersensibilizarea în masă la taurine faţă de streptomicină (Simon şi Misley, 1976); trombocitopenia cu simptome de purpură la cîine (Ioshi, 1976).

Perrin şi Oldstone (1977) au cercetat complexele antigen viral — anticorpi în cazul virusului rujeolos, stabilind că acestea pot fi cuplate la suprafaţa celulelor HeLa; dintre componentele virale, numai hemaglutinina era prezentă în cadrul complexelor formate. Astfel de complexe, formate la suprafaţa celulelor, constituie o sursă importantă a complexelor circulante, participante la procesele etiopatogenetice ale virozelor umane şi animale.

XI.2.3. Fenomenul de tip Arthus

Fenomenul Arthus local. Reacţiile de hipersensibilizare de tip Arthus se caracterizează prin specificitate şi declanşare imediată. Sensibilizarea se realizează prin inocularea antigenului, chiar fără substanţe adjuvante. Administrarea antigenului este urmată de biosinteza anticorpilor precipitanţi; ca atare, manifestările fenomenului pot fi declanşate numai după o perioadă de cel puţin 7—8 zile.

Antigenele care induc starea de sensibilizare de tip Arthus sînt foarte variate; grupările haptenice incluse în acestea pot declanşa răspunsurile caracteristice, ca şi antigenul omolog total, chiar dacă sînt inoculate fără suportul proteic.

Anticorpii participanţi la reacţie sînt strict umorali, nefiind fixaţi la celule; dealtfel, fixarea la celule nu reprezintă un fenomen obligatoriu în declanşarea manifestărilor clinice. Ca şi în fenomenul de citoliză alergică, mecanismul principal al realizării fenomenului este reprezentat de formarea complexelor antigen-anticorp, însoţită de implicarea complementului; la locul inocularii antigenului declanşator se acumulează substanţe leucotactice, trombocite, leucocite. Polimerii antigen-anticorp sînt fagocitaţi de leucocitele polimorfonucleare; infiltraţia locală continuă cu aport masiv de limfocite, macrofage şi, în stadiul final, leucocite eozinofile. Leucocitele fagocitare degenerează, element care dă reacţiei caracterul necrotic. Formarea complexelor antigen-anticorp a fost dovedită cu ajutorul testului de imunofluorescenţă; complexele au fost evidenţiate în vasele sanguine mici şi în ţesuturi, în zona în care a fost inoculat antigenul declanşator. Ca urmare se produc leziuni grave ale endoteliilor vasculare, tromboze, hemoragii, edeme, necroze etc.

Sensibilizarea de tip Arthus poate fi transmisă pasiv numai prin serul purtător de anticorpi precipitanţi al donatorului. *Fenomenul Arthus direct* se realizează prin inocularea anticorpilor (serului) pe cale intravenoasă şi a antigenului declanşator pe cale intradermică. *Fenomenul Arthus inversat* se reproduce prin inocularea locală, intradermică, a serului purtător de anticorpi şi a antigenului pe cale intravenoasă. În ambele cazuri, la locul inocularii unuia dintre reagenţi, pe cale intradermică, se produce reacţia cutanată locală inflamatorie.

Reacţiile de tip Arthus au o evoluţie deosebit de rapidă. Nu este necesară o perioadă de aşteptare între inocularea anticorpilor şi inocularea antigenului, dat fiind faptul că nu este implicată etapa intermediară de fixare a anticorpilor la celulele efectoare. Ca ur-

Scanned with OKEN Scanner

mare, imediat după inocularea reagenţilor apar edeme, hemoragii, infiltraţii intense, necroze.

Fenomenul Arthus a fost reprodus la porc, în condiţii experimentale, folosind ca antigen sensibilizant lizozimul (Metzger, 1976). Reacţia locală s-a caracterizat prin eritem intens, hemoragie locală şi necroză, uneori, cu pierdere de substanţă.

Reacţiile Arthus pulmonare sînt manifestări patologice care se desfăşoară la nivelul aparatului respirator în urma inhalării unor pulberi de origine vegetală sau animală. Astfel de stări au fost descrise la om dar şi la animalele domestice (bovine şi cabaline). Printre antigenele care pot induce reacţii pulmonare de tip Arthus se numără şi sporii de *Micropolyspora faeni* care se găsesc în fîn.

În urma repetării contactului cu antigenul sensibilizant, în pulmon se formează infiltraţii şi granuloame cu limfocite, leucocite polinucleare şi histiocite, însoţite de fibrozarea ţesutului interstiţial.

Semnele clinice declanşate constau din respiraţia accelerată, dispneică şi tuse.

Ghergheriu şi Baba (1977) au descris afecţiuni de tip Arthus la nivelul aparatului respirator la bovine, prezentînd particularităţile fiziopatologice ale sindromului.

Pirie şi col. (1971), Wiseman şi col. (1973) au descris un sindrom respirator la taurine provocat, cu multă probabilitate, de inhalarea unor substanţe sensibilizante din fînul contaminat cu un actinomicet termofil, *Micropolyspora faeni*. Examenele histologice efectuate la o parte dintre animale au evidenţiat infiltraţia difuză a septurilor alveolare cu limfocite şi plasmocite, leziuni bronşiolitice, bronşiolită obliterantă, granuloame şi fibroza septurilor alveolare. Autorii au preparat antigene din *M. faeni* şi *Aspergillus fumigatus*; efectuînd testul de dublă imunodifuziune în gel de agar, au fost decelaţi anticorpii precipitanţi faţă de *Micropolyspora* la 83% şi faţă de *Aspergillus* la 33% dintre bovinele din fermă. Patogeneza şi modificările histologice, ca şi rezultatele testării serologice permit încadrarea sindromului descris între manifestările de tip Arthus la nivelul aparatului respirator.

Boala serului reprezintă o manifestare generalizată, sistemică a fenomenului de tip Arthus. Patogeneza sindromului se bazează pe formarea complexelor antigen-anticorp în urma inocularii unor cantităţi mari de ser terapeutic. Complexele se depun în arteriole, pereţii articulaţiilor şi glomerulii renali. Reacţiile antigen-anticorp, cu participarea complementului, sînt urmate de acumularea unor infiltraţii leucocitare şi necrozarea ţesuturilor; manifestările clinice şi morfologice se traduc prin glomerulonefrită, arterite, precum şi prin unele manifestări generale.

Metzger (1976) a reprodus fenomenul Arthus generalizat la porc prin inocularea declanşatoare a lizozimului pe cale intravenoasă.

XI. 3. Hipersensibilizarea de tip tardiv

Starea de hipersensibilizare de tip tardiv se defineşte ca un fenomen imun, mediat celular, care se poate constitui în absenţa anticorpilor circulanţi decelabili prin metode obişnuite; manifestările declanşate de inocularea antigenului sensibilizant devin evidente după un timp mai lung în comparaţie cu hipersensibilizarea de tip imediat.

Caracterul imunologic specific al fenomenului este demonstrat de necesitatea realizării sensibilizării prealabile cu un antigen şi de declanşarea reacţiei numai în urma unui nou contact cu acelaşi antigen.

Scanned with OKEN Scanner

Se poate transmite pasiv de la donatori sensibili dar numai prin celule purtătoare ale informației antigenice. Starea de hipersensibilizare transferată prin celule are o durată limitată de menținerea integrității funcționale a celulelor transmise primitorului; această durată este dependentă de gradul de înrudire genetică și antigenică între donator și primitor. S-a demonstrat, de asemenea, că hipersensibilizarea de tip tardiv se transferă prin extracte obținute din celulele sensibilizate care conțin așa-numitul *factor de transfer*; acesta este eliberat de către limfocitele aflate în contact cu antigenul.

În condiții experimentale, factorul de transfer poate fi obținut prin liza celulelor (tratare la presiuni înalte, congelări-decongelări etc.) sau prin reproducerea unor reacții antigen-anticorp *in vitro*. Are o greutate moleculară de aproximativ 10 000; nu are proprietăți antigenice, este format dintr-un complex polinucleotidic-polipeptidic și este dializabil. Factorul de transfer predă informația antigenică unui număr redus de limfocite; prin proliferare clonală, acestea ating un prag de dezvoltare suficient pentru ca animalul primitor să manifeste starea de hipersensibilizare.

Intervenția acestui factor în transmiterea stării de hipersensibilizare nu este unanim acceptată, în special în urma unor experimentări făcute pe modele *in vitro*.

Inducerea stării de hipersensibilitate întîrziată se obține prin inocularea antigenului în cantități reduse, de preferință însoțit de un adjuvant de tip Freund. În procesul de inducere intervin, într-o primă etapă, celulele fagocitare care preiau antigenul și îl fragmentează, realizînd în același timp analiza și codificarea informației. Informația antigenică este ulterior transferată celulelor specializate din seria T, la nivelul ganglionilor limfatici. Unele elemente experimentale atestă și posibilitatea preluării directe a informației de către limfocite. În continuare, sînt constatate restructurări ale morfologiei unor organe imunocompetente. În ganglionii limfatici modificările interesează centrii germinativi; se acumulează imunoblești, celule care prezintă pironinofilie, pe cînd celulele plasmatice sînt prezente în număr redus.

Celulele implicate în realizarea hipersensibilizării de tip întîrziat sînt limfocitele de tip T care au capacitatea de a recunoaște antigenul prin receptorii de membrană. Limfocitele activate proliferează și se transformă în celule blastice, caracterizate printr-o longevitate deosebită și prin faptul că păstrează în continuare sensibilizarea specifică față de antigenul inductor. În cazul reinoculării antigenului sensibilizant, aceste celule sînt mobilizate și devin celule efectoare în cadrul reacțiilor specifice care se declanșează. Limfocitele T pot participa și la lezarea unor „celule-țintă", în urma contactului direct cu acestea și prin eliberarea unor substanțe efectoare, între care o importanță deosebită au mediatorii chimici ai acestei stări. Existența acestor factori prezintă și un interes practic; o serie de metode de diagnostic al imunității mediate celular se bazează pe evidențierea factorului de inhibare a migrării macrofagelor, a factorului de transformare limfocitară etc. Participarea celulelor T la mecanismul hipersensibilizării de tip tardiv este demonstrată de dezvoltarea deficitară a acestor stări la animalele cu afecțiuni morfo-funcționale ale timusului.

Testul de formare a rozetelor — E a fost aplicat de Felsburg și Edelman (1977) în corelație cu hipersensibilizarea mediată celular în tuberculoză și tularemie. Autorii apreciază că testul este deosebit de specific și util în studiul hipersensibilizării de tip tardiv și în diagnosticul rapid al unor boli microbiene.

Scanned with OKEN Scanner

Antigenele care au capacitatea de a induce fenomenul de hipersensibilizare de tip tardiv sînt îndeosebi proteice. Specificitatea componentei proteice este hotărîtoare în cazul unor antigene complexe, incluzînd grupări haptenice neproteice ca dinitroclorbenzenul, participant la inducerea fenomenului de hipersensibilizare la cal (Hodgin, 1976). Haptenele sînt lipsite de capacitatea de a declanşa reacţiile de hipersensibilizare întîrziată. Woodard şi col. (1978) au produs acest fenomen la viţei folosind un antigen constituit dintr-o glicolipidă.

Specificitatea imunologică a reacţiilor de tip întîrziat este destul de ridicată; cu toate acestea, manifestările caracteristice pot fi declanşate şi de factori antigenici înrudiţi dar nu identici.

Manifestările caracteristice fenomenului de hipersensibilizare de tip tardiv se pot reproduce după cel puţin 5—6 zile de la inocularea antigenului sensibilizant.

Declanşarea modificărilor de către antigen este cunoscută prin întîrzierea caracteristică a debutului reacţiilor. Iniţial, la locul inocularii se realizează o infiltraţie cu leucocite polimorfonucleare, urmată de infiltraţia cu limfocite sensibilizate specific faţă de antigenul inoculat. Pe lîngă limfocite, factor esenţial în declanşarea şi evoluţia reacţiei de hipersensibilizare, mai intervin macrofagele activate de către limfocite.

Unele manifestări ale stării de hipersensibilizare de tip întîrziat sînt asigurate şi de prezenţa anticorpilor citofili pentru macrofage. Aşa este cazul fenomenului de inhibare a migrării macrofagelor.

Limfocitele sensibilizate acumulate la locul inocularii antigenului eliberează o serie de mediatori chimici, ca urmare a interacţiunii cu antigenul. Aceste substanţe, biologic active, generate de limfocite în urma activării specifice (de către antigen) sau nespecifice (de către mitogeni chimici) sînt cunoscute sub denumirea de *limfokine*. Sînt substanţe solubile, net diferite de imunoglobulinele-anticorpi, determină creşterea permeabilităţii vasculare, accentuează incorporarea timidinei tritiate de către culturile de limfocite şi inhibă migrarea macrofagelor in vitro (Dumonde şi col., 1969).

Factorul leucotactic, eliberat de asemenea la locul de inoculare a antigenului, determină acumularea celulelor mononucleare care sînt apoi blocate la locul reacţiei de factorii de inhibare a migrării leucocitelor. Rezultă de aici o serie de tulburări ale circulaţiei, cu apariţia semnelor de edem şi necroză, procese în care intervin şi macrofagele. Se manifestă, în acelaşi timp, fenomene de proliferare accentuată a limfocitelor şi a macrofagelor.

Intensitatea reacţiei locale este în funcţie de gradul sensibilizării celulelor participante la reacţie, de capacitatea de mobilizare a acestora şi de unele proprietăţi calitative (prezenţa purtătorului proteic şi a haptenei) şi cantitative (doză, concentraţie) ale antigenului inoculat.

XI. 3.1. Fenomene de hipersensibilizare în infecţii

O serie de microorganisme au proprietatea de a induce, în organismele infectate, stări de imunitate mediată celular. Fenomenul a fost descris de Koch care l-a observat la cobaii expuşi unui contact repetat cu bacilul tuberculozei.

Procesele de imunizare mediată celular se pot desfăşura concomitent cu cele de biosinteză a anticorpilor dar au o perioadă de latenţă (pînă la atingerea unui nivel sesizabil prin metodele cunoscute) mai lungă.

Scanned with OKEN Scanner

Ca şi în cazul altor antigene inductoare ale stărilor de hipersensibilizare, pentru iniţierea, dezvoltarea şi manifestarea stării de hipersensibilizare specifică de infecţie sînt necesare două intervenţii ale antigenului; inocularea inductoare şi inocularea declanşantă.

În cazul tuberculozei, manifestarea morfo-clinică se poate realiza local, prin inocularea intradermică a germenilor sau a extractelor de cultură (tuberculină veche, de tip Koch, tuberculoproteină purificată). În cazul inoculării pe cale subcutanată, se produce o reacţie inflamatorie specifică locală însoţită de reacţii de focar, în ţesuturile în care se află leziuni tuberculoase. Inocularea corneană este urmată de apariţia modificărilor locale. Inocularea pe cale intravenoasă se traduce prin febră, simptome generale, uneori deosebit de grave, chiar moartea animalului inoculat. Reacţiile tuberculinice locale şi generale sînt însoţite şi de răspunsuri caracteristice din partea ganglionilor limfatici regionali.

Celulele implicate în procesul de hipersensibilizare tuberculinică sînt în primul rînd limfocitele, dar şi alte leucocite mononucleare precum şi macrofage.

Felsburg şi Edelman (1977) constată că limfocitele purificate obţinute de la indivizi cu reacţii tuberculinice pozitive, cultivate în prezenţa PPD, prezintă o accentuare a capacităţii de a forma rozete active, acest efect nefiind obţinut în cazul limfocitelor provenite de la indivizi tuberculino-negativi. Testul este specific faţă de antigenul care a indus hipersensibilizarea specifică la donatorii de limfocite. Autorii consideră că metoda permite studierea *in vitro* a mecanismelor imunităţii mediate celulare. Limfocitele formatoare de rozete au capacitatea de a transfera pasiv sensibilitatea tuberculinică la cobai (Păunescu şi Dănălache-Dumitrescu, 1979).

Răspunsurile imune mediate celular asigură în unele situaţii distrugerea germenilor patogeni sensibilizanţi prin:

— acţiunea directă a limfocitelor, prin contactul nemijlocit al acestora cu germenii; distrugerea agenţilor patogeni se realizează uneori împreună cu distrugerea celulelor efectoare;

— eliberarea de limfokine de către limfocite; unele dintre acestea acţionează prin mobilizarea macrofagelor şi accentuarea activităţii acestora; ca urmare, macrofagele fagocitează germenii (printr-un mecanism care, în această etapă, a devenit nespecific); limfokinele mobilizează şi leucocitele polimorfonucleare care îndeplinesc un rol similar cu cel al macrofagelor.

Principalele limfokine evidenţiate pînă în prezent sînt:

— limfokine care acţionează asupra macrofagelor şi produc inhibiţia migrării, agregarea, modificări morfologice, modificări biochimice etc.;

— limfokine care acţionează asupra limfocitelor, avînd un efect mitogenetic;

— limfokine active faţă de leucocitele polimorfonucleare, cu efect chemotactic sau de inhibare a migrării;

— limfokine care acţionează asupra altor celule (fibroblaste, HeLa, celule L la şoarece etc.);

— interferonul;

— limfokine ale căror activităţi se caracterizează prin inhibiţia clonării sau inhibiţia proliferării celulelor HeLa.

În cazul infecţiilor virale, în urma interacţiunii antigen-limfocite sensibilizate, poate avea loc fenomenul de producere şi eliberare a interferonului.

Între hipersensibilizarea de tip întîrziat şi rezistenţa faţă de infecţie există unele corelări, datorate în special participării la ambele procese a aceluiaşi grup de organe şi celule imunocompetente. În acelaşi timp, cele două procese care rezultă în urma unei infecţii (chiar dirijată şi utilă, prin vaccinare) trebuie considerate ca fiind

Scanned with OKEN Scanner

independente chiar dacă în anumite perioade ale evoluţiei lor, manifestă aceeaşi intensitate. Astfel, anularea reactivităţii tuberculinice prin desensibilizare nu este însoţită şi de dispariţia stării de rezistenţă iar recăpătarea reactivităţii nu semnifică o mărire a gradului de rezistenţă. Intensitatea reactivităţii la tuberculină nu este corelată şi cu indiciul rezistenţei; constatări făcute în cazul infecţiei tuberculoase la taurine şi păsări atestă că evoluţia procesului patologic şi prognoza acestuia nu pot fi interpretate în funcţie de intensitatea reacţiilor tuberculinice.

În afara bacililor tuberculozei, alte micobacterii, în primul rînd *Mycobacterium paratuberculosis*, induc stări de hipersensibilizare mediată celular. În aceeaşi situaţie se află şi alţi agenţi bacterieni ca bacilul morvei, *Salmonella*, *Escherichia*, *Brucella*, *Chlamydia* (F a y e şi col. 1975) şi unii fungi ca *Aspergillus*, *Histoplasma* şi *Trichophyton*.

O serie de autori au demonstrat participarea limfocitelor sensibilizate specific la iniţierea şi evoluţia hipersensibilizării specifice în infecţiile cu micobacterii: B e r g m a n (1975) în infecţia cu *M. avium* la porc, M ü l l e r şi J o n e s (1973), N i l s s o n şi M a g n u s s o n (1973), C h a p a r a s şi col. (1970), M u s c o p l a t şi col. (1975) în tuberculoza umană, M u s c o p l a t şi col. (1975) şi W o o d a r d şi col. (1978) în infecţia cu micobacterii la viţei, B u r g e l t şi col. (1978) în paratuberculoză şi alţii. Autorii citaţi au obţinut în cazurile cercetate reacţii pozitive la testul de stimulare imună a limfocitelor.

Micoplasmele au de asemenea capacitatea de a induce stări de hipersensibilizare mediată celular. Astfel, B i b e r f e l d (1974), B i b e r f e l d şi col. (1974) au demonstrat prezenţa acesteia la pacienţii infectaţi cu *Mycoplasma pneumoniae*, aplicînd testele de inhibiţie a migrării leucocitelor şi de imunostimulare a limfocitelor.

O serie de virusuri au capacitatea de a produce, pe lîngă răspunsul prin anticorpi umorali, stări de imunizare mediată celular. În unele infecţii virale acestea pot fi decelate prin teste cutanate cu antigene virale, prin transferul cu ajutorul celulelor sensibilizate şi prin teste *in vitro* (transformarea limfocitelor, inhibarea migrării macrofagelor). Tratamentele efectuate cu ser antilimfocitar pot inhiba imunizarea mediată celular. Şi în cazul infecţiilor virale, inducerea fenomenelor de imunizare mediată celular implică creşterea rezistenţei organismului.

Existenţa imunizării mediate celular a fost evidenţiată, prin metode de laborator, în unele viroze animale. Astfel, W i t t m a n (1976) constată această situaţie în cazul bolii lui Aujeszky la porcine, folosind testul indirect de inhibiţie a migrării macrofagelor. Capacitatea limfocitelor de porc de a modifica mobilitatea macrofagelor de cobai normal în prezenţa antigenului viral a fost observată după 4 zile de la infecţia experimentală şi s-a accentuat ulterior. Testul de stimulare a limfocitelor a fost aplicat de asemenea, cu rezultate similare.

B e r g m a n şi col. (1978) au indus fenomenul de imunitate mediată celular la viţei în vîrstă de pînă la 4 săptămîni, prin inocularea tulpinilor „intens-neuraminidazice" de virus PI-3. Autorii au aplicat testul de stimulare a limfocitelor pentru demonstrarea prezenţei stării de hipersensibilizare specifică. Stări similare au obţinut F a y e şi col. (1975) cu virusurile IBR şi BVD.

Instalarea stării de hipersensibilizare de tip tardiv are o deosebită însemnătate practică. Pe existenţa acestei stării se bazează o serie de metode de diagnostic *in vivo* şi *in vitro* care permit depistarea indivizilor contaminaţi şi aplicarea măsurilor cores-

Scanned with OKEN Scanner

punzătoare pentru evitarea extinderii unor infecţii. Dintre acestea, sînt bine cunoscute, în primul rînd, metodele aplicate pentru diagnosticul tuberculozei, paratuberculozei, brucelozei, morvei etc.

XI. 3.2. Alte manifestări ale fenomenului de hipersensibilizare de tip întîrziat

În patologia umană sînt cunoscute şi sînt relativ importante manifestările unor stări de hipersensibilizare în care sînt implicate procese similare celor descrise anterior.

Dermatita alergică de contact este produsă în urma contactelor repetate cutanate cu agenţi chimici neanimaţi ca medicamente (neomicina, antihistaminice, anestezice locale, sulfamide ş.a.), coloranţi, compuşi ai unor metale (mercur, crom, nichel), cauciuc. Împreună cu proteinele din epidermă, aceste substanţe realizează conjugate complexe capabile să determine sensibilizarea limfocitelor de tip T. Din punct de vedere clinic se constată leziuni exsudative, ulcere şi descuamaţii.

Alergia serică, manifestare descrisă anterior, este reluată avînd în vedere participarea unor procese de tip celular, caracteristice hipersensibilizării de tip întîrziat, pe lîngă cele semnificative pentru fenomenul generalizat de tipul Arthus.

Eliminarea grefelor de ţesuturi sau organe evoluează în general prin două mecanisme care acţionează sinergic: formarea anticorpilor faţă de antigenele de organ străin şi inducerea stării de hipersensibilizare mediată celular.

În patogeneza altor sindroame intervin, de asemenea, mecanisme care sînt incluse în categoria celor mediate celular: nevritele alergice, anemiile pernicioase, artritele reumatoide şi altele.

Campbell şi col. (1975) au arătat că în cheratita superficială cronică a cîinelui intervine un mecanism încadrabil în grupul stărilor de hipersensibilizare mediată celular. Cîinii cu această afecţiune au prezentat reacţii pozitive la testul de inhibiţie a migrării leucocitelor efectuat cu antigene preparate din *Staphylococcus aureus* şi proteine extrase din cornee şi iris.

O stare similară a fost realizată în condiţii experimentale de Metzger (1976) la porc, prin inocularea lizozimului purificat din albuş de ou împreună cu adjuvant Freund complet. Prezenţa hipersensibilizării a fost confirmată prin testul intradermic efectuat cu antigen omolog şi prin testul de imunostimulare a limfocitelor.

Dvorak şi Dvorak (1974) au descris un grup de reacţii de hipersensibilizare de tip întîrziat pe care le-au denumit hipersensibilitate cutanată bazofilă (HCB). Aceasta poate fi indusă prin metode de imunizare în care nu se folosesc adjuvanţi micobacterieni; histologic, la locul reacţiei se observă infiltraţii masive cu leucocite bazofile şi celule mononucleare. Antigenele care pot induce HCB includ printre altele, virusuri, celule tumorale, alogrefe cutanate. Patogeneza HCB este probabil similară cu cea a hipersensibilităţii de tip tardiv, implicînd interacţiunea limfocitelor T cu antigenul, urmată de eliberarea mediatorilor. Dvorak şi col. (1977) au descris şi o formă sistemică a hipersensibilizării cu celule bazofile. Leziuni asemănătoare au fost descrise de Friedlander şi Dvorak (1977) la nivelul corneei cobailor sensibilizaţi cu antigene proteice.

Scanned with OKEN Scanner

XI. 4. Hipersensibilizarea de tip Sanarelli-Schwartzman

Fenomenele de tip Sanarelli-Schwartzman au etiologia şi mecanismele de producere încă insuficient cunoscute. În condiţii experimentale, inocularea unei doze de extract polizaharidic dintr-o bacterie Gram negativă, pe cale intradermică la iepure, este urmată doar de declanşarea unei reacţii inflamatorii de scurtă durată şi de intensitate redusă. În cazul în care, după 24 ore, se inoculează pe cale intravenoasă o nouă doză din acelaşi extract (sau extract obţinut din alt germen Gram negativ) la locul primei inoculări se înregistrează o reacţie inflamatorie şi deosebit de severă, mergînd pînă la hemoragie şi necroză. Această variantă a reacţiei este locală (de tip Schwartzman).

Din punct de vedere histologic, la locul apariţiei reacţiei se constată o infiltraţie formată din trombocite şi leucocite, urmată de acumularea masivă a leucocitelor polimorfonucleare, lezionarea pereţilor vaselor sanguine mici, necroză şi depozite de fibrină.

În cazul în care ambele inoculări (preparativă şi declanşatoare) se efectuează pe cale intravenoasă se produce fenomenul în varianta sa sistemică, generalizată (tip Sanarelli), caracterizată prin scăderea temperaturii corporale a animalului, hipotensiune, leucopenie accentuată, convulsii.

Pentru realizarea sensibilizării iniţiale este necesar ca antigenul polizaharidic să fie inoculat fără adjuvant. Este dealtfel stabilit că cele mai active substanţe complexe în provocarea acestor fenomene aparţin endotoxinelor

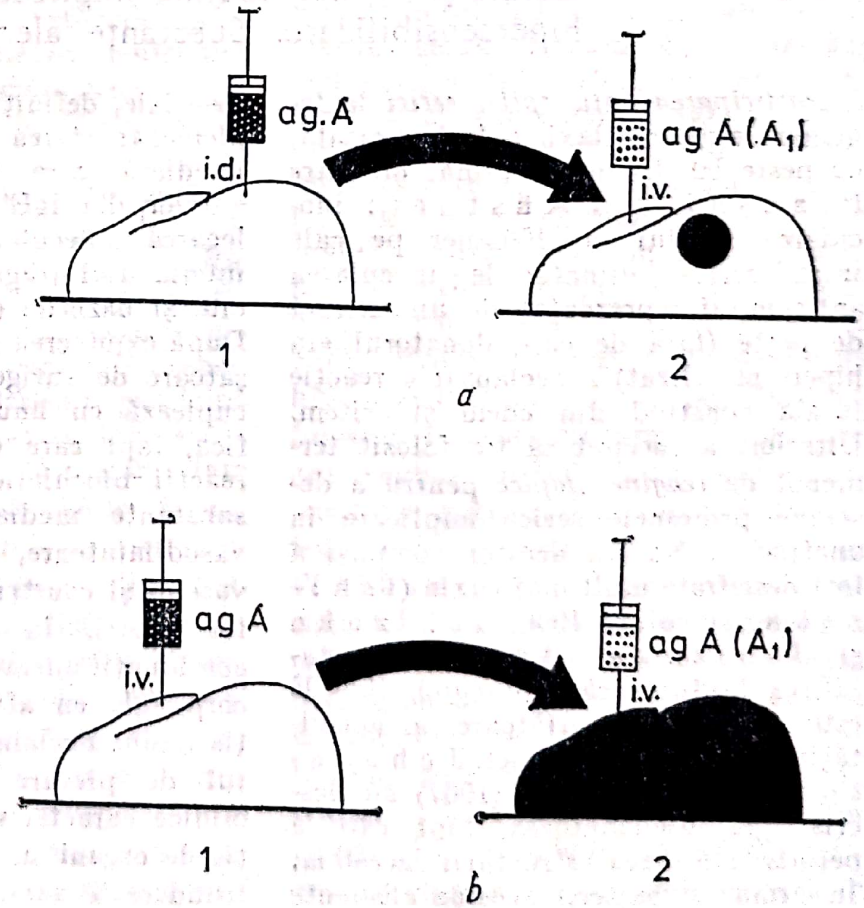


Fig. 23 — Reprezentarea schematică a fenomenelor Sanarelli-Schwartzman forma locală (a) şi generală (b)

bacteriene, proteina purtătoare neavînd un rol deosebit.

În realizarea fenomenelor de tip Sanarelli-Schwartzman este caracteristic timpul foarte scurt impus de dezvoltarea sensibilizării (1—2 zile), element care exclude participarea anticorpilor sintetizaţi în urma primului contact cu antigenul sensibilizant. Există părerea după care fenomenul poate fi indus la animale purtătoare de lungă durată a unei flore bacteriene intestinale, cu participarea germenilor Gram negativi; antigenele acestor germeni pot fi implicate în pregătirea sensibilizării. În acelaşi timp, deşi leziunile indică o reacţie tipică de hipersensibilizare, este de subliniat că fenomenul este evident nespecific. Între antigenul sensibilizant şi cel declanşator pot exista diferenţe de structură uneori foarte mari; răspunsul poate fi obţinut chiar dacă a doua inoculare este făcută cu un antigen care nu are nici o înrudire imunologică cu antigenul sensibilizant.

În evoluţia ambelor variante ale fenomenului de tip Sanarelli-Schwartzman (fig. 23), inocularea unei endotoxine pe cale intravenoasă este urmată de acţiunea acesteia asupra leucocitelor sensibilizate care sînt lizate; are loc eliberarea masivă a unor mediatori chimici care acţionează în primul rînd asupra sistemului vascular. În acelaşi timp, eliberarea unor enzime concură la declanşarea unor fenomene de liză celulară, cu apariţia semnelor consecutive de necroză.

Sensibilizarea de tip Sanarelli-Schwartzman nu poate fi transferată altor animale prin ser sau prin celule, fapt care confirmă, în plus, caracterul nespecific al fenomenului.

XI. 5. Celule şi imunoglobuline implicate în fenomenele de hipersensibilizare. Substanţe alergenice

Participarea anticorpilor serici la fenomenele de anafilaxie a fost sesizată, cu peste 50 de ani în urmă, de către Prausnitz şi Küstner: inocularea serului lui Küstner pe cale intradermică, urmată de inocularea antigenului reprezentat de un extract de peşte (faţă de care donatorul era hipersensibilizat) a declanşat o reacţie locală constînd din edem şi eritem. Ulterior, a început să fie folosit termenul de *reagine atopice* pentru a desemna proteinele serice implicate în anafilaxie. Natura acestor compuşi a fost descifrată mult mai tîrziu (Ishizaka şi col. — 1966, Ishizaka şi Ishizaka — 1968), prin stabilirea faptului că imunoglobulina E este principala purtătoare a activităţii anticorpilor reaginici. Johansson şi Bennich (1967) au descris IgE mielomatoasă, fapt care a permis studierea structurii acesteia. În urma cunoaşterii acestor elemente esenţiale, definiţia menţionată se completează: starea de hipersensibilizare imediată care rezultă prin sinteza anticorpilor IgE se caracterizează prin legarea moleculelor IgE specifice, prin intermediul fragmentului Fc, la mastocite şi bazofile (Ishizaka - 1973). După expunerea gazdei la doza declanşatoare de antigen implicat, acesta se cuplează cu imunoglobulina E specifică, fapt care determină o suită de reacţii biochimice şi eliberarea unor substanţe mediatoare, cu activitate vasodilatatoare, de permeabilizare a vaselor şi constrictoare asupra muşchilor netezi. În cazul realizării unor combinaţii adecvate de antigen şi anticorp IgE cu afinitate ridicată, reacţia imună declanşată va constitui punctul de plecare pentru manifestările clinice caracteristice diferite, în funcţie de organism, alergen, calea de pătrundere a acestuia etc.

Scanned with OKEN Scanner

Prezenţa anticorpilor IgE corelaţi cu starea de anafilaxie la bovine (produsă experimental sau în urma unor infestaţii parazitare) a fost comunicată de M o s s m a n n şi col. (1978).

S-a demonstrat însă că, alături de IgE, la fenomenele de hipersensibilizare de tip imediat participă şi imunoglobulinele din clasa G. Astfel, B e m r i c k şi col. (1977) au constatat că antigenele extrase din *Parascaris equorum* induc un fenomen anafilactic, cu formarea anticorpilor circulanţi din clasa IgG.

Termenul *alergen* este în prezent folosit pentru a defini o substanţă care induce biosinteza anticorpilor IgE (deci a reaginelor) şi ca urmare, hipersensibilizarea (sensibilizarea alergică) la om şi animale. Substanţele alergenice au, în general, greutăţi moleculare destul de mari şi sînt reprezentate de proteine, glicoproteine sau hidraţi de carbon. Au origine vegetală sau animală şi sînt străine faţă de organismul la care pot induce stări de hipersensibilizare. Complexe alergenice pot fi formate şi prin complexarea unor grupări haptenice cu proteine proprii organismului.

Substanţele alergenice acţionează în general în doze foarte mici, asupra organismelor care au o predispoziţie genetică faţă de una sau mai multe dintre aceste substanţe. Factorii genetici care concură la realizarea sensibilizării de către alergeni participă la controlul concentraţiei IgE şi la asigurarea capacităţii de răspuns faţă de stimularea alergică. Căile de intrare ale alergenilor sînt, în mod deosebit, cea respiratorie şi cea digestivă.

Cei mai cunoscuţi alergeni sînt reprezentaţi de substanţele care se găsesc în polen, seminţele de bumbac şi ricin, unii dextrani, substanţe transmise prin înţepături de insecte, unele alimente, praful din încăperi, unii acizi etc. La oamenii infestaţi cu ascarizi a fost constatată dezvoltarea unei stări alergice. De asemenea, M o t a şi col. (1969) au constatat că extractele de *Trichinella spiralis* induc formarea la cobai a unor anticorpi reaginici.

Principalele categorii de celule implicate în declanşarea semnelor morfo-clinice ale fenomenelor de hipersensibilizare imediată sînt bazofilele, mastocitele şi probabil macrofagele; preponderenţa participării uneia sau alteia dintre aceste tipuri de celule la declanşarea simptomelor de anafilaxie este controversată. Prin aplicarea metodelor autoradiografice, s-a demonstrat că la om, celulele-ţintă pentru IgE sînt în primul rînd leucocitele bazofile, fapt confirmat şi prin evidenţierea la microscopul electronic a moleculelor de IgE la suprafaţa acestor celule (S u l l i v a n şi col., 1971). Aceleaşi date au fost stabilite şi la iepure (S i r a g a n i a n şi O s l e r, 1971, H e n s o n şi C o c h r a n e, 1971). C o n r o y şi col. (1977) au determinat numărul de molecule IgE cuplate la celulele bazofile, stabilind că fiecare celulă fixează 4000—500 000 molecule; aceste valori au fost strîns corelate cu concentraţia IgE în serul sanguin. Studiind celulele din diverse ţesuturi care fixează IgE s-a evidenţiat că acestea sînt mastocitele, prezente, printre altele, în ţesutul cutanat, intestinul subţire, pulmon, bronhii (T o m i o k a şi I s h i z a k a, 1971). Reaginele prezente în stările de hipersensibilizare la bovine au fost folosite pentru prepararea unui ser antireaginic, metoda bazîndu-se pe capacitatea anticorpilor reaginici de a se fixa la mastocite (N i e l s e n şi W i l k i e, 1977). Aceste date experimentale demonstrează că principalele categorii de celule care eliberează histamina sînt leucocitele bazofile şi mastocitele. Dealtfel, expulzarea histaminei de către aceste celule în urma realizării la suprafaţa lor a legăturilor receptori de membrană-anticorpii IgE-antigen specific a fost demonstrată în

Scanned with OKEN Scanner

condiţii experimentale. Cercetări efectuate prin aplicarea unor tehnici autoradiografice au stabilit că, în cazul unor suspensii celulare din pulmon, IgE este fixată la mastocite în timp ce IgG aderă la macrofage şi neutrofile; în timp ce mastocitele au eliberat histamina şi substanţa lent reactivă a anafilaxiei, acest fenomen nu a fost observat la celulele pe care erau fixate molecule de IgG. Rezultă că numai mastocitele participă la eliberarea histaminei. În schimb, originea substanţei lent reactive nefiind complet elucidată, se poate presupune (I s h i z a k a , 1973) că mastocitele eliberează o substanţă activă care reacţionează cu alte celule, ca macrofagele, determinînd astfel eliminarea în mediul tisular a acestui mediator chimic.

N i e l s e n (1976) a determinat prezenţa anticorpilor reaginici în serul bovin prin interpretarea modificărilor induse la mastocitele de şobolan (degranulare şi eliberare de mediatori chimici). Fixarea imunoglobulinelor-reagine la mastocite a fost demonstrată şi prin metode radiobiologice.

Mastocitele de şobolan, incubate cu anticorpi reaginici bovini, au fixat ulterior imunoglobulina anti-IgE umană; acest fapt demonstrează existenţa unei reactivităţi încrucişate între reaginele bovine şi cele umane.

***

Cunoaşterea mecanismelor implicate în inducerea şi evoluţia stărilor de hipersensibilizare prezintă o deosebită importanţă. Aceasta rezidă nu numai în existenţa unor afecţiuni a căror patogeneză este bazată pe reacţiile de hipersensibilizare de tip imediat sau tardiv, specifice sau nespecifice, mai ales dacă se reţine incidenţa relativ redusă a acestora la animale (cel puţin în stadiul actual al cunoştinţelor şi al aplicării metodologiilor adecvate de cercetare şi diagnostic).

Mecanismele de hipersensibilizare sînt participante indiscutabile la evoluţia unor boli, în primul rînd a celor cu etiologie infecţioasă sau parazitară. O serie de fenomene patologice semnalate în boli ca anemia infecţioasă a cabalinelor, unele forme ale infecţiilor colibacilare, rujetul şi multe altele recunosc mecanisme ale imunităţii mediate celular.

Importanţa precumpănitoare a cunoaşterii stărilor de hipersensibilizare şi a modului în care acestea intervin în evoluţia unor boli este rezultatul posibilităţilor de diagnostic pe care le oferă (teste cutante *in vivo*, teste de evidenţiere a unor mediatori eliberaţi de limfocite etc.).

Scanned with OKEN Scanner

XII Reacţii antigen-anticorp. Metode aplicate în imunodiagnosticul unor stări patologice

XII. 1. Generalităţi

Reacţiile antigen-anticorp au o importanţă practică deosebită, atît în cercetările privitoare la procesele imunologice cît şi în diagnosticul bolilor în care sînt implicate astfel de fenomene.

Noţiunile referitoare la antigen şi la efectorii imuni celulari şi umorali au prezentat elementele de bază care intervin în realizarea reacţiilor antigen-anticorp. Acestea sînt, în ultimă instanţă, determinanţii antigenici şi situsurile de combinare ale imunoglobulinelor (fig. 24, 25).

Fenomenul de cuplare a antigenului cu anticorpii corespondenţi decurge în două etape:

Fig. 24 — Reprezentarea schematică a unor variante ale cuplării antigen-anticorp

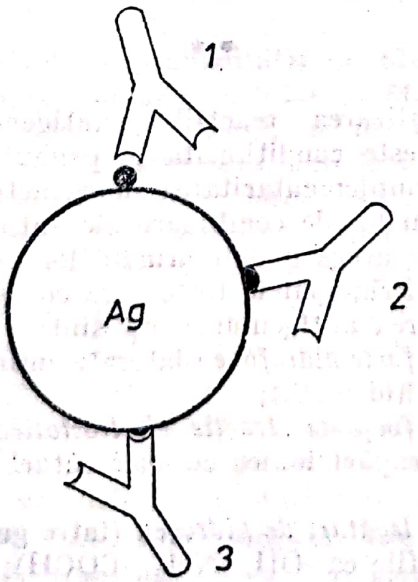
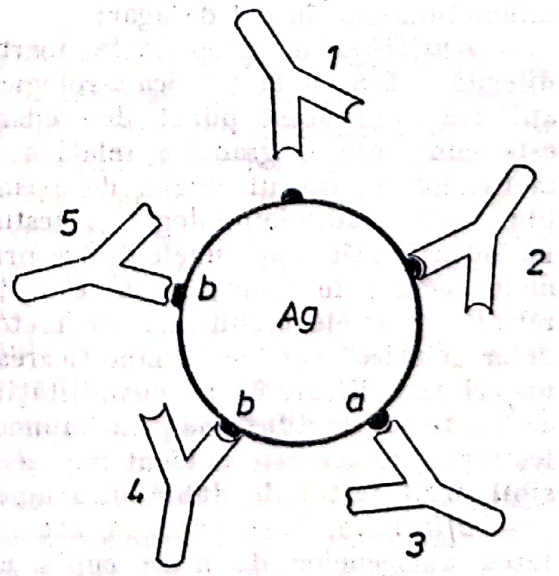


Fig. 25 — Reprezentarea schematică a cuplării antigen-anticorp

1—2 — procesul de cuplare a anticorpilor cu aviditate maximă (sistem omolog); *3* — reacţia anticorpilor faţă de antigenul *a* cu aviditate scăzută; *4* — anticorp faţă de antigenul *a* foarte avid, care reacţionează parţial cu determinanţii antigenului *b* (intensitatea legăturilor scăzută în comparaţie cu sistemul omolog); *5* — anticorp faţă de antigenul *a* cu aviditate scăzută; reacţionează parţial cu determinanţii antigenului *b*; intensitatea legăturilor foarte scăzută



— formarea imediată a complexelor antigen-anticorp la nivel molecular individual; complexele formate îşi păstrează în continuare solubilitatea componentelor şi nu determină reacţii vizibile prin metode obişnuite ci numai prin teste deosebit de sensibile ca testul radio-imunologic şi cuantificarea capacităţilor de fixare a antigenului;

— formarea conglomeratelor de complexe antigen-anticorp de dimensiuni macroscopice, insolubilizarea lor şi crearea posibilităţii de vizualizare sau de interpretare prin tehnici mai puţin sensibile; în funcţie de natura antigenului şi a anticorpilor introduşi în reacţie, declanşarea acesteia se traduce prin forme variate de exteriorizare: precipitare, aglutinare, fixare de complement etc.

Principalele caracteristici ale reacţiilor antigen-anticorp sînt următoarele:

— *specificitatea*, proprietate de importanţă deosebită, care asigură decelarea şi identificarea componentelor necunoscute introduse în reacţie; fenomenul de reacţie încrucişată reprezintă un aspect particular al acestei proprietăţi; el se traduce prin posibilitatea apariţiei unor reacţii antigen-anticorp în sisteme heteroloage, în cazul existenţei unor antigene cu determinanţi înrudiţi; astfel de reacţii încrucişate sînt puse în evidenţă, în cele mai bune condiţiuni, prin testul de imunodifuziune în gel de agar;

— *sensibilitatea*, proprietate foarte diferită în funcţie de tehnica serologică aplicată; din acest punct de vedere este cunoscută o gradaţie relativă a metodelor, în cadrul căreia, de exemplu, testul radio-imunologic şi testul imunoenzimatic ocupă unele dintre primele locuri; în acelaşi timp, este de reţinut că unele modificări ale metodelor „clasice" conduc la modificarea, uneori semnificativă, a sensibilităţii; astfel, testul de difuziune prin imunoelectroprecipitare este evident mai sensibil decît testul de dublă difuziune;

— *afinitatea*, care exprimă capacitatea antigenelor de a se cupla cu anticorpii, în funcţie de gradul de similitudine combinativă între determinanţii antigenici şi situsurile de combinare ale anticorpilor. Astfel, anticorpii cu un grad ridicat de afinitate produc, cu relativă uşurinţă şi rapiditate, complexe avînd constante de disociere la nivel scăzut; anticorpii cu afinitate redusă nu sînt capabili să participe la realizarea etapei secundare a reacţiei antigen-anticorp. Afinitatea anticorpilor este redusă în prima perioadă a imunogenezei, în comparaţie cu aceea a anticorpilor sintetizaţi în cursul răspunsului secundar; acest fenomen nu este dependent de eventuale deosebiri între moleculele IgM şi IgG, deoarece de exemplu, IgG elaborată în cadrul răspunsului primar are o afinitate inferioară faţă de IgG sintetizată în a doua etapă a sintezei de anticorpi;

— *aviditatea* exprimă intensitatea cuplării antigenului cu anticorpii corespondenţi, fiind dependentă de afinitatea acestora. Şi în acest caz, anticorpii formaţi precoce în cadrul biosintezei au un grad de aviditate inferior în comparaţie cu anticorpii induşi în etapele ulterioare ale răspunsului imun. Anticorpii formaţi în faza iniţială nu au situsuri de combinare în totalitate „corespondente" cu întreaga grupare a determinanţilor antigenici şi, ca urmare, complexele formate se disociază cu uşurinţă.

***

Realizarea reacţiilor antigen-anticorp este condiţionată în primul rînd de complementaritatea de structură a situsurilor de combinare ale anticorpilor cu aceea a determinanţilor antigenici. Principalele forţe care concură la cuplarea antigen-anticorp sînt:

— *forţe hidrofobe* (datorate aminoacizilor hidrofobi);

— *forţe de atracţie electrostatică* (între grupări ionice cu încărcătură diferită);

— *legături de hidrogen* (între grupări hidrofile ca -OH, $-NH_2$, -COOH);

Scanned with OKEN Scanner

— *forțe van der Waals* care se exercită între molecule nepolare ca rezultat al interacțiunii dintre electroni și nucleele moleculelor.

Reacțiile antigen-anticorp sînt reversibile, cinetica lor fiind dependentă de constantele de viteză caracteristice reacției directe și reacției inverse.

Studiul interacției primare dintre antigen și anticorp implică aplicarea unor metode ca determinarea capacității de legare a antigenului, radioimunodozarea, imunoadsorbția cantitativă, variante ale imunofluorescenței. Pentru definirea interacției secundare se aplică metode cunoscute, diferite în funcție de natura antigenului și de condițiile de reacție: precipitare, neutralizare, fixare de complement etc. (O n i c a, 1978).

În cadrul acestui capitol vor fi prezentate în continuare, unele dintre principalele metode care se bazează pe reacția antigen-anticorp. Sînt omise metodele clasice (testele de aglutinare, testele de fixare a complementului și altele) a căror aplicare este foarte largă și ale căror principii sînt bine cunoscute. O atenție deosebită va fi acordată unor metode mai mult sau mai puțin recente dar încă insuficient aplicate în patologia animală. Apreciem că extinderea folosirii unor metode de acest fel va reprezenta un aport substanțial la aprofundarea etiopatogenezei unor boli și la ameliorarea metodologiilor de diagnostic al acestora.

În afara tehnicilor care se bazează pe reacția dintre antigen și anticorp, o serie de metode permit evidențierea unor elemente celulare sau umorale participante la fenomenele imunologice.

În acest sens, pot fi citate metodele de evidențiere a imunoglobulinelor serice prin electroforeză simplă, electroforeză în gel de poliacrilamidă, refractometrie sau prin precipitare cu diverse săruri. Acestea din urmă, în special în cazul folosirii sulfatului de zinc sau a sulfitului de sodiu, se caracterizează prin simplitate și un grad suficient de acurateţe.

Capitolul de față nu are scopul de a prezenta descrierea acestor metode simple și bine cunoscute; în schimb, vor fi incluse unele teste care permit diferențierea celulelor implicate în răspunsul imun.

XII. 2. Metode de testare a capacității de răspuns imun la nivel celular

Evidențierea capacității de răspuns imunologic la nivel celular capătă, în măsură tot mai mare, o deosebită extindere. Numeroasele metode elaborate în ultimii ani permit studierea funcționalității sistemului celular complex al imunității și, prin aceasta, aprecierea directă sau indirectă a cauzelor unor afecțiuni avînd ca mecanism principal deficite ale acestui sistem. Este cunoscut faptul că deficitele de la nivelul celulelor implicate în răspunsul imun determină stări patologice primare sau condiționează evoluția unor afecțiuni determinate de germeni cu patogenitate redusă; sînt tot atît de importante și urmările negative ale deficitului imunologic celular asupra intensității răspunsului organismului față de orice proces de imunizare activă.

Metodele devenite clasice, prin care sînt investigate aspecte citologice cantitative și calitative în organele participante la răspunsul imun sau în sînge, și-au păstrat, în bună măsură, importanța pentru realizarea unor informații utile. În cele ce urmează, astfel de metode nu vor fi analizate; în schimb, vor fi expuse unele tehnici elaborate sau îmbunătățite în ultimii ani.

Scanned with OKEN Scanner

XII. 2.1. Testul de hemoliză localizată în gel

Pentru realizarea metodei este folosit un mediu-suport semisolid în care sînt incorporate celulele producătoare de anticorpi. Tehnica permite evidenţierea calitativă şi semicantitativă a imunoglobulinelor cu activitate de anticorp faţă de globulele roşii. În acest scop, este necesar ca animalul la care este urmărită capacitatea de răspuns la nivelul unor ţesuturi sau organe să fie inoculat cu doze adecvate de hematii heteroloage (provenite de la un animal dintr-o altă specie, de preferat după un control al imunogenităţii globulelor roşii recoltate de la un anumit donator). În scopul testării, se realizează o suspensie mixtă de hematii şi celule limfoide de la animalul imunizat. Anticorpii-hemolizine sînt eliberaţi în soluţie şi se cuplează cu globulele roşii în mediul gelifiat. În prezenţa complementului, se realizează liza hematiilor şi formarea unor zone de hemoliză (decolorarea mediului pe suprafeţe de formă circulară, avînd dimensiunea razei în funcţie de cantitatea de anticorpi sintetizată de celulele imunocompetente testate).

Metoda de hemoliză localizată în gel a fost elaborată de J e r n e şi col. (1963). Ulterior, ea a fost aplicată de numeroşi autori care au demonstrat utilitatea sa în stabilirea numărului de celule formatoare de anticorpi antihematii şi a intensităţii procesului imun declanşat prin inocularea acestora.

Înainte de inocularea antigenului corpuscular, la animale „normale" din acest punct de vedere, poate fi constatată uneori existenţa unui număr redus de celule cu activitate hemolitică ($60/10^8$ celule limfoide, după S t e r z l şi R i h a, 1965). După imunizare numărul de celule formatoare de anticorpi creşte (30 000 celule dintr-un total de 10^8 testate după autorii citaţi); ulterior, numărul acestor celule scade, cinetica procesului avînd o curbă diferenţiată în funcţie de numeroşi factori ca specia de animal, imunogenitatea hematiilor, celulele limfoide testate etc. După D r e s s e r şi W o r t i s (1965), prin testul de hemoliză sînt decelaţi anticorpii aparţinînd clasei IgM; a fost stabilită existenţa unei corelaţii între activitatea hemolitică şi evidenţierea anticorpilor macroglobulinici. În acelaşi timp, a fost demonstrat faptul că anticorpii IgM sînt mai activi în determinarea lizei globulelor roşii de oaie, în prezenţa complementului, în comparaţie cu anticorpii din clasa IgG.

D r e s s e r şi W o r t i s (1965) au realizat o metodă pentru decelarea celulelor care produc anticorpi cu eficienţă hemolitică scăzută. În acest scop, după realizarea amestecului celule limfoide-hematii, se adaugă un ser anti-IgG (preparat prin hiperimunizare cu IgG de la specia de animal a cărui capacitate de răspuns imun este testată); se adaugă apoi complement şi în acest fel se obţin răspunsuri evident mai intense. Activitatea hemolitică de intensitate redusă aparţine în primul rînd anticorpilor din clasa IgG.

B u c h m a n n şi S c h u m a n n (1971) au studiat răspunsul imun celular la porc folosind ca antigen hematii de oaie şi ca metodă de evaluare metoda hemolizei localizate în gel de agar. Ei au constatat că intensitatea răspunsului depinde de doza de antigen, calea de inoculare şi vîrsta aimalelor, fără a exista o corelare a acestuia cu nivelul anticorpilor umorali (hemaglutinine şi hemolizine).

Este evident faptul că metoda de hemoliză localizată în gel de agar are unele limite, determinate în primul rînd de posibilitatea de aplicare numai pentru antigenele constituite din globule roşii. Cu toate acestea, metoda are largi aplicaţii în studierea capacităţii de răspuns imun la nivel celular prin condiţiile pe care le oferă pentru aprecierea acesteia, printr-o tehnică relativ simplă.

Scanned with OKEN Scanner

XII. 2.2. Teste de formare a rozetelor de globule roşii

Existenţa receptorilor pentru globulele roşii de oaie (sau de alte specii) pe suprafaţa limfocitelor se află la baza fenomenului de aderenţă a hematiilor la aceste celule mononucleate ale seriei albe. Condiţii diferenţiate de realizare a testului permit identificarea calitativă şi cantitativă a limfocitelor de tip T şi B.

Formarea rozetelor „simple". Metoda se bazează pe captarea eritrocitelor de oaie de către receptorii de membrană ai limfocitelor timus-dependente (T). Legăturile realizate sînt de obicei destul de puţin solide şi viabile, dar, prin aplicarea unor variante ale metodei, ele pot fi stabilizate.

Pentru realizarea testului, suspensia de globule roşii (tratată în mod diferenţiat pentru asigurarea stabilităţii celulelor) este amestecată în proporţii diferite cu suspensia de limfocite. După o uşoară centrifugare şi incubare, se prepară frotiuri care se examinează după colorarea prin metoda May-Grünwald-Giemsa. Se consideră că sînt limfocite de tip T acele celule la care au aderat cel puţin 3 globule roşii, bineînţeles după eliminarea din calcul a celulelor contaminante (polimorfonucleare, monocite).

Metode de determinare cantitativă a limfocitelor B. Tehnicile folosite în scopul evaluării numărului de celule limfoide de tip B se bazează pe existenţa la aceste celule a imunoglobulinelor de suprafaţă şi a receptorilor pentru fragmentul Fc al imunoglobulinelor şi pentru componenta C_3 a complementului. Se apreciază că 10—25% din limfocitele circulante au astfel de markeri de suprafaţă. Metodele de identificare a imunoglobulinelor de suprafaţă sînt cele mai folosite, utilizîndu-se în acest scop antiseruri faţă de imunoglobulinele totale sau faţă de anumite clase de imunoglobuline, în special IgG şi IgM. Este de reţinut şi faptul că nu toate limfocitele B au, concomitent, markeri imunoglobulinici, Fc şi C_3.

Metoda de determinare a receptorilor de membrană pentru C_3 se bazează pe *tehnica formării rozetelor „imune"* (rozete EAC, prescurtare care semnifică eritrocite-anticorpi-complement). Celulele indicatoare sînt eritrocitele, de obicei de oaie, tratate cu anticorpi eritrocitari şi complement. Eritrocitele sînt tratate cu doze subhemaglutinante de IgM antiglobule roşii de oaie obţinut de la iepuri hiperimunizaţi şi complement. În urma contactului dintre suspensia de limfocite şi amestecul EAC se formează aşa-numitele rozete — fenomen de aderenţă a minimum 3 globule roşii la limfocitul de tip B. Examinarea prin microscopie electronică de baleiaj a acestor rozete permite evidenţierea unor aderenţe membrană-membrană deosebit de intense.

Decelarea imunoglobulinelor de suprafaţă ale limfocitelor B se realizează în special prin testul de imunofluorescenţă directă sau indirectă. În cazul primei variante, un ser anti-imunoglobuline (imunoglobulină din clasele G, A sau M), cuplat cu FITC, permite evidenţierea directă a imunoglobulinelor de suprafaţă ale limfocitelor (foto XII.1, 2, 3).

În scopul realizării metodei indirecte se foloseşte un ser imun (a) faţă de imunoglobulinele speciei pentru care urmează să se facă determinări ale limfocitelor B, precum şi un ser imun (b), preparat de obicei pe iepure, cu imunoglobuline ale speciei pe care s-a realizat serul (a). Suspensiile de limfocite sînt tratate cu serul (a) şi ulterior, după etapele obişnuite în testul de imunofluorescenţă, cu serul (b) marcat cu izotiociant de fluoresceină. Examinarea unui număr suficient de limfocite permite stabilirea proporţiei dintre cele de tip B (fluorescente) şi cele de tip T. La interpretarea rezultatelor este necesar să se ţină seama că şi fagocitele pot prezenta imunofluorescenţă, datorită imunoglobulinelor absorbite; ele pot fi identificate şi, ca urmare,

Scanned with OKEN Scanner

excluse din calcul, prin examinare microscopică în contrast de fază. Metoda, deosebit de sensibilă, presupune o pregătire minuţioasă a examinatorului şi a reagenţilor; aplicarea acestora implică, de asemenea, testări prealabile în vederea alegerii concentraţiilor reagenţilor, a timpilor de reacţie etc., diferiţi pentru fiecare sistem de testare în parte.

P ă u n e s c u şi col. (1978) au aplicat testul de rozetare EAC la bovine normale şi cu leucoză constatînd că la animale normale procentul de limfocite B este în medie de 9,44, în timp ce la cele cu diagnostic de LEB confirmat este de 34,65.

G a l a t i u c şi col. (1979) au studiat variante ale tehnicii de rozetare în scopul caracterizării subpopulaţiilor de limfocite umane, aplicînd proporţii diferite de hematii, temperaturi diferite de incubaţie, hematii de om, oaie sau de bou, procedee de sensibilizare cu anticorpi IgG sau IgM, IgM şi complement, tratarea prealabilă cu proteina izolată din *Staphylococcus aureus*.

XII. 2.3. Testul de imunostimulare a limfocitelor

Imunostimularea limfocitelor de către antigenul corespondent specific reprezintă o exprimare a procesului de imunitate mediată celular, fiind corelată cu fenomenul de hipersensibilizare pus în evidenţă *in vivo* prin teste cutanate.

Principiul metodei. Limfocitele normale izolate din sîngele periferic şi incubate în medii de cultură speciale în prezenţa unor substanţe mitogene (lecitine vegetale, produse microbiene, molecule anorganice) se transformă în celule blastice. Proporţia de celule care suferă procesul de transformare şi evoluţia răspunsului mitotic sînt dependente de stimulantul limfocitar (natura şi îndeosebi specificitatea acestuia — în cazul unor stări de hipersensibilizare). Intensitatea transformării limfocitelor este determinată cantitativ prin incorporarea timidinei (sau altei substanţe cu capacitate de marcare radioactivă) în acidul dezoxiribonucleic al celulelor în curs de diviziune mitotică. Rata şi cantitatea izotopului încorporat, exprimată prin valoarea *i.p.m.* (impulsuri pe minut) reflectă intensitatea răspunsului şi este direct corelată cu numărul de celule care au răspuns pozitiv faţă de mitogenul şi antigenul folosit.

Materiale necesare şi efectuarea testului. Limfocite de la animalul care urmează să fie testat. Se recoltează probe de sînge în tuburi siliconate care conţin heparină, EDTA sau ACD; limfocitele se obţin prin metoda tratării cu ficoll-diatrizoate sau in gradient de densitate de Ficoll-Isopaque.

Sîngele total este în prealabil diluat cu un volum egal de mediu de cultură sau cu soluţie tampon Hanks. Celulele sanguine sînt depuse pe suprafaţa amestecului Ficoll-Isopaque în tuburi sterile de centrifugă.

Se centrifughează la 400 g timp de 30 minute. Eritrocitele şi leucocitele polimorfonucleare se depun la baza coloanei. Leucocitele mononucleare şi trombocitele se vor acumula între stratul de plasmă şi cel de Ficoll-Isopaque.

Celulele mononucleare se recoltează din fiecare tub. Suspensia de celule se suspensionează în soluţie tampon Hanks şi se spală de 2—4 ori pentru îndepărtarea anticoagulantului, plasmei şi Ficoll-Isopaque.

Se spală de două ori cu soluţie tampon Hanks.

Limfocitele se ajustează la o concentraţie de $1,5 \times 10^6$ celule/ml în mediul RPMI — 1640 (conţinînd 20% ser fetal bovin, l-glutamină, penicilină şi streptomicină).

Determinarea numărului de celule se realizează microscopic, cu ajutorul unui hemocitometru, folosind un colorant

Scanned with OKEN Scanner

vital, sau cu un aparat automat electronic de tip Coulter-counter.

Tuberculine purificate sau alte substanţe revelatoare de acelaşi tip, capabile să inducă imunostimularea limfocitelor.

Se pregătesc culturi de limfocite în triplicat: 0,2 ml suspensie de limfocite reacţionează cu 2 micrograme PPD sau alt antigen în plăci de cultură. Martori care nu conţin PPD sînt incluşi în sistemul de reacţie.

Pentru a evidenţia condiţiile de transformare pentru limfocite se includ de asemenea culturi conţinînd fitohemaglutinină în concentraţie de 1% (v/v). Fitohemaglutinina se hidratează înainte de folosire cu mediul RPMI-1640.

Culturile de limfocite se incubează la 37°C, 120—144 ore, în atmosferă cu 5% bioxid de carbon, umidifiată 100%.

Cu 18 ore înainte de terminarea cultivării, culturile sînt tratate cu timidină tritiată (1μCi/cultură, cu activitate specifică de 6,7 Ci/m mol).

Înainte de efectuarea unor testări, este necesar să fie stabilite condiţiile de realizare a culturilor de limfocite: timpul de cultivare pentru celule cu capacităţi diverse de răspuns, curbele doză/răspuns faţă de mitogeni şi antigene, standardizarea cantităţii şi activităţii specifice a timidinei radioactive, alegerea momentului optim pentru marcarea cu timidină.

Recoltarea limfocitelor se realizează cu un aparat multiplu semiautomat.

Radioactivitatea se determină la un spectrometru cu scintilaţie lichidă.

Sinteza ADN limfocitar se exprimă sub forma raportului de stimulare (IPM culturi + antigen/IPM culturi nestimulate). Gradul de transformare (imunostimulare) limfocitară este deci notată prin numărul de impulsuri/minut de izotop radioactiv (de exemplu H^3 sau C^{14}) încorporat în acidul dezoxiribonucleic al limfocitelor care proliferează.

Microtehnica cu sînge total se efectuează după o metodologie asemănătoare, înlocuindu-se cultura de limfocite cu sîngele total recoltat de la animalele testate. După Buergelt şi col. (1977) rata sintezei acidului dezoxiribonucleic este măsurată cu ajutorul incorporării I^{125}-5-iodo-2'-deoxiuridinei de către limfocitele stimulate cu fitohemaglutinină; mitogenii folosiţi sînt de tipul tuberculinelor purificate.

Curtet şi Le Mevel (1976) au realizat un test rapid, care poate fi interpretat în cîteva ore. Autorii au determinat sinteza proteică la limfocite imunostimulate cu ajutorul leucinei marcate cu H^3, aplicînd testul la şoareci şi cobai, apoi la om, în cazuri de limfom.

Aplicaţii ale metodei. Imunostimularea limfocitelor, fenomen caracteristic stărilor de hipersensibilizare, reprezintă în acelaşi timp o metodă aplicată în tot mai mare măsură în decelarea acestor stări; în unele situaţii, testul de imunostimulare a limfocitelor s-a dovedit a fi superior celor alergice tradiţionale, de tipul tuberculinării.

În cazul tuberculozei, testul a fost folosit la om şi maimuţă. La viţei infectaţi experimental cu *Mycobacterium bovis* sau *Mycobacterium avium* Muscoplat şi col. (1975) au demonstrat că limfocitele de la animale hipersensibilizate prezintă o înglobare semnificativă de timidină tritiată ca răspuns faţă de tuberculina purificată omoloagă, în timp ce tuberculina heteroloagă induce o stimulare de intensitate redusă sau aceasta este practic absentă în unele etape ale evoluţiei infecţiei. Stimularea specifică a avut o intensitate crescîndă la determinările efectuate după 2, 4 şi 6 săptămîni de la infecţie. Încă la 2 săptămîni după inocularea micobacteriilor, testul de imunostimulare a limfocitelor permite diferenţierea speciei bacteriene cu care s-a realizat infecţia, fapt pe care, cu o singură excepţie, autorii nu îl reuşesc prin testul tuberculinic.

Alhaji şi col. (1974), Nilsson şi Magnusson (1973) au aplicat TIL pentru titrarea activităţii

Scanned with OKEN Scanner

biologice a tuberculinelor. La *Macaca mulatta* infectată cu *Mycobacterium bovis*, stimularea limfocitelor cu PPD preparat din *M. tuberculosis* a fost semnificativ mai intensă decît la martorii neinfectaţi şi decît stimularea indusă de PPD aviar. Buergelt şi col. (1978) au aplicat acelaşi test pentru diagnosticul paratuberculozei, folosind varianta cu sînge total. La 40—60% dintre animalele testate a fost obţinut un răspuns pozitiv, faţă de 4—6,7% la RFC, 1,2—1,4% la testul de imunodifuziune şi 2,4—6% la examenul bacteriologic direct din fecale. Răspunsurile la testul de imunotransformare a limfocitelor au fost evident mai intense faţă de johnina purificată, în comparaţie cu tuberculinele PPD mamiferă şi aviară.

Prin TIL este posibilă decelarea unor diferenţe foarte mici între antigene înrudite — ca de exemplu între virusurile *Herpes simplex* de tip 1 şi tip 2.

Pentru determinarea răspunsului celular specific *in vitro* au mai fost folosite antigene preparate din tulpini de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* şi *Candida albicans* (Cunningham-Rundles şi col., 1976).

TIL este de asemenea util în decelarea unor deficienţe imunologice, element tot mai mult cercetat în legătură cu unele stări patologice ale omului dar, încă insuficient studiat la animale domestice. Cîteva exemple sînt utile pentru înţelegerea importanţei metodei. Astfel, la pacienţii cu sindromul Di George (dezvoltarea anormală a timusului însoţită de deficienţe ale imunităţii mediate celular), limfocitele nu răspund la fitohemaglutinină. La copiii cu imunodeficienţă combinată severă funcţia sistemelor celulare P şi T este deficitară, constatîndu-se fenomenul de limfopenie severă; limfocitele care pot fi recoltate de la astfel de pacienţi nu răspund la mitogeni şi antigene *in vitro*. În cazul bolii lui Hodgkin se constată valori anormale la testul de transformare a limfocitelor *in vitro*.

Testul de imunostimulare a limfocitelor prezintă unele avantaje evidente faţă de testele cutanate aplicate direct pe animalele controlate: absenţa unor factori care pot influenţa reacţia (alte infecţii, modificări ale mediului intern, stadiul de evoluţie al bolii), posibilitatea de a cerceta concomitent mai multe preparate antigenice (element tehnic mai greu de realizat pe animale), sensibilitatea deosebită a metodei, gradul înalt de specificitate. În acelaşi timp, testul de imunostimulare are şi dezavantaje evidente, în primul rînd necesitatea unor laboratoare dotate cu aparatura şi substanţele necesare efectuării testărilor.

XII. 2.4. Transformarea blastică a limfocitelor (metoda directă)

Fenomenul de transformare blastică a limfocitelor provenite de la un animal sensibilizat, cultivate *in vitro* în prezenţa antigenului, a fost observat de Mills (1966), apoi de Oppenheim (1967).

Principiul metodei. Dacă o suspensie de limfocite prelevate de la un animal sensibilizat se cultivă *in vitro* în prezenţa antigenului specific, se constată după un interval de timp creşterea numărului de celule blastice mari şi numeroase mitoze.

Transformarea blastică a celulelor *in vitro* se datoreşte stimulării metabolismului celular ca urmare a reacţiei dintre antigen şi structurile membranei limfocitelor. În urma cuplării antigenului cu receptorii de pe suprafaţa limfocitelor specific sensibilizate, membrana celulară se activează declanşînd transmiterea unui semnal spre nucleu, ceea ce determină iniţierea sintezei de ADN. Ca urmare, are loc o creştere a dimensiunilor celulelor, nucleul de-

Scanned with OKEN Scanner

venind mai mare, cu cromatina laxă şi citoplasma bazofilă.

Variantele metodei. Procesul de transformare blastică a limfocitelor poate fi urmărit printr-o metodă relativ simplă şi anume prin examenul microscopic al preparatelor colorate, executate la diferite intervale de timp din culturile de limfocite.

Observarea proliferării se poate face şi cantitativ prin estimarea procentuală a replicărilor cromozomiale după tratarea cu colchicină.

Tehnica de executare a testului în cazul estimării procentului de forme blastice vizibile în frotiuri este următoarea: se prelevează limfocitele din sîngele periferic şi se cultivă în prezenţa unui antigen cu care animalul donator a fost sensibilizat în prealabil. La intervale diferite de timp se execută frotiuri din culturile respective, care se colorează şi se examinează microscopic pentru prezenţa celulelor blastice, mari. Dacă se constată existenţa acestora, se consideră reacţia pozitivă, formele blastice reprezentînd un indicator al prezenţei imunităţii mediate celular la donator.

Aplicaţii. Testul de transformare blastică a limfocitelor constituie una din metodele de studiu *in vitro* al mecanismelor imune prin care se pun în evidenţă reacţiile limfocitelor provenite din organismele sensibilizate în prezenţa antigenului corespunzător, reacţii care pot fi folosite şi în scop de diagnostic.

Unii cercetători cum este Kerly (1968) şi alţii, constată că există o relaţie între intensitatea reacţiei *in vitro* a limfocitelor cu antigenul şi dimensiunea intradermoreacţiei la antigen.

XII. 2.5. Inhibarea migrării celulelor (testul inhibării migrării macrofagelor)

Reacţia de inhibare a migrării macrofagelor se bazează pe observaţia după care tuberculina exercită un efect inhibitor asupra migrării celulelor din explante de ganglioni limfatici ai cobailor cu tuberculoză, efect absent în cazul cobailor normali.

George şi Vaughan (1962) pun la punct o tehnică asemănătoare, mai accesibilă, aceea a inhibării migrării macrofagelor în prezenţa antigenului.

Principiul metodei. În cursul procesului de hipersensibilizare, celulele implicate în răspunsul imun eliberează o serie de factori care acţionează ca mediatori ai răspunsului imun. Prezenţa acestora poate fi detectată *in vitro* folosind ca indicator macrofagele obţinute din exsudatul peritoneal de la un animal (cobai) inoculat cu un antigen. Testul se practică în camere (flacoane) de cultivare a celulelor în care se introduc tuburi capilare ce conţin macrofagele recoltate de la un animal hipersensibilizat, tasate prin centrifugare. Flacoanele astfel pregătite se împart în două grupe — într-unele se introduce mediu de cultură simplu (199 M), iar în altele acelaşi mediu la care se adaugă însă şi antigenul cu care au fost hipersensibilizate animalele de la care au fost recoltate celulele. După incubare se constată că în flaconul în care s-a introdus mediul simplu, macrofagele ies din tubul capilar şi migrează sub formă de evantai, în timp ce în flacoanele în care s-a introdus mediul cu adaos de antigen, migrarea este oprită. Aceasta se datoreşte prezenţei unui factor secretat de un număr mic de limfocite prezente (colectate inevitabil odată cu macrofage) stimulate de antigen.

Pentru a demonstra că factorul inhibant al migrării macrofagelor este eliberat de limfocite T sensibilizate *in vitro*, testul se efectuează asociind limfocitele unui animal sensibilizat cu macrofagele unui animal normal şi paralel alt amestec asociind macrofage de la un animal sensibilizat şi limfocite

Scanned with OKEN Scanner

normale. După adăugarea antigenului se constată inhibarea migrării în primul caz (limfocite de animal sensibilizat + macrofage de animal normal) şi absenţa inhibării în al doilea caz (macrofage de animal sensibilizat + limfocite de animal normal). Această experienţă dovedeşte că limfocitele sînt responsabile de existenţa factorului care opreşte migrarea macrofagelor, deoarece limfocitul T sensibilizat *in vivo*, venind în contact *in vitro* cu antigenul corespunzător, eliberează un factor numit factor inhibant al migrării macrofagelor (MIF=macrophage migration inhibition factor) care acţionează asupra acestor celule indiferent de antigenul care le-a produs. Macrofagele reprezintă în acest caz indicatori nespecifici ai reacţiei dintre antigen şi limfocitele specific sensibilizate.

Materiale necesare. Macrofagele se recoltează prin spălarea cavităţii abdominale la cobai cu soluţie fiziologică. Cobaiul trebuie să fi fost hipersensibilizat în prealabil cu antigen. În vederea obţinerii unei cantităţi mari de macrofage, se poate administra intraperitoneal cobaiului, cu cîteva zile înaintea recoltării, oleu de parafină;

— tuburi capilare;

— camere (flacoane) de tipul celor folosite pentru culturi celulare;

— medii de cultură utilizate pentru cultivarea celulelor (199 M);

— antigenul — acelaşi cu cel utilizat pentru hipersensibilizarea cobaiului de la care se recoltează macrofagele.

Efectuarea testului. Suspensia de macrofage se introduce într-un capilar, care se închide la flacără şi apoi se centrifughează pentru tasarea celulelor. După centrifugare, se secţionează tubul la înălţimea depozitului celular. Porţiunea de capilar cu depozitul de macrofage se pune într-un flacon de tipul celor folosite pentru culturi celulare, apoi se adaugă mediul de cultură. Se pregătesc în acest fel două camere cu tuburi capilare conţinînd sedimente de macrofage şi mediu de cultură. Apoi se adaugă într-una antigenul, iar cealaltă se lasă ca martor, fără antigen. Ambele se incubează şi apoi se măsoară suprafaţa acoperită cu celule migrate în afara tubului capilar.

Interpretarea rezultatelor. În cazul cînd a avut loc migrarea, macrofagele ies din tubul capilar sub forma unui evantai, dacă însă migrarea este inhibată, celulele rămîn în capilar sau zona de migrare este foarte mică.

Pentru a face o estimare cantitativă a înhibării migrării macrofagelor în prezenţa antigenului, se aplică formula următoare (D a v i d, 1965, citat de P ă u n e s c u , 1975):

$$\frac{\text{Suprafaţa migrării în prezenţa antigenului} \times 100}{\text{Suprafaţa migrării în absenţa antigenului}} = \text{IM}\%$$

în care IM% este indicele de inhibiţie a migrării în prezenţa antigenului, exprimat procentual. Dacă există o stare de hipersensibilitate mediată celular faţă de antigenul folosit în reacţie, valoarea acestui indice este mai mică decît unitatea.

Antigenele bacteriene, virale, fungice şi proteice care produc hipersensibilitate întîrziată provoacă şi inhibiţia migrării macrofagelor. Inhibiţia *in vitro* se poate obţine cu doze mici de antigen (0,1 mg/ml); între concentraţia de antigen şi gradul de sensibilitate există un paralelism, pînă la un anumit prag (P ă u n e s c u, 1975).

XII. 2.6. Examene citologice directe

Pe lîngă metodele cunoscute de examinare a elementelor celulare (frotiurile de sînge, secţiuni histologice etc.), au fost elaborate procedee tehnice care permit evidenţierea mai pregnantă a unor modificări esenţiale în teritoriul

Scanned with OKEN Scanner

S.C.I. Chiar dacă modificările respective nu sînt interpretate numai din punctul de vedere al unor reacţii de tip imun, faptul că interesează celulele implicate în răspunsul imun are repercusiuni notabile pentru acest sistem.

Examinarea leucocitelor după prealabila lor concentrare (LCT). Metoda constă din examinarea leucocitelor după o prealabilă centrifugare a plasmei sanguine şi eliminarea elementelor hematice. Produsul astfel obţinut se etalează pe lame şi se colorează atît clasic panoptic cît şi cu acridin-oranj pentru examinări în lumină ultravioletă sau pentru tehnica IF. În acest fel se evidenţiază foarte uşor o gamă largă de celule circulante cît şi un număr foarte ridicat pe un cîmp microscopic. Faţă de metoda clasică „a frotiului de sînge" permite stabilirea mult mai corectă a leucogramei, imunoleucogramei etc. Metoda a fost aplicată în diagnosticul pestei porcine clasice, anemiei infecţioase a cabalinelor şi în leucoze. Pesta porcină clasică se diagnostică în special graţie tehnicii IF (imunofluorescenţă) care evidenţiază reacţia specifică în celulele patognomonice „paralimfoblaştii". În anemia infecţioasă se evidenţiază un număr apreciabil de celule histio-monocitare şi limfoblastice iar în leucoze, elementele ţinere-blastice şi atipice (Manolescu, 1976) (foto XII. 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25).

Examinarea măduvei hematopoetice prin medulogramă. Metoda constă din examinarea sucului medular recoltat prin puncţie osoasă şi etalat pe lame, apoi colorat panoptic şi cu acridin-oranj. Se evidenţiază astfel tipurile celulare din măduvă cu modificările specifice sau nespecifice ale acestora. Are o largă aplicabilitate în practică furnizînd informaţii cu privire la sindroamele inflamatorii, imunoalergice proliferative.

În afară de faptul că examinarea măduvei hematopoetice cu ajutorul tehnicii medulogramei dă indicaţii orientative în numeroase stări patologice ea oferă posibilitatea de a se obţine şi date de diagnostic ca în pesta porcină clasică, în leucoze.

La acestea din urmă, medulograma oferă date cu privire la tipul celular proliferat, diferenţiind formele acute de cele cronice, leucemia limfoidă de cea histio-monocitară, reticulară sau mieloidă (foto XII. 26, 27, 28, 29 30, 31, 32, 33).

Tehnica de microscopie electronică în baleiaj (SEM). O altă tehnică modernă de citologie cu implicaţii largi în imunologie este cea de microscopie electronică în baleiaj (SEM) cu care se poate stabili într-un timp foarte scurt imunoleucograma. În stările de reactivitate normală a S.C.I. şi în stările de reactivitate deficitară (leucoze) prin această tehnică se pot identifica toate celulele implicate în răspunsul imunologic fie ele „blaste" sau „cite" de la macrofag monocit la limfocitele „T" şi „B". Metoda se suprapune pînă la un punct tehnicii LCT pe care se bazează, cu diferenţa că LCT se colorează şi se interpretează la microscopul fotonic iar cel ce serveşte examinării în baleiaj foloseşte o prelucrare specifică acestuia iar citirea se face pe ecranul Video al microscopului electronic de baleiaj. Tehnica a fost aplicată în studiul unor forme de leucoză la om şi animale (Manolescu şi col., 1978, 1979) (foto XII. 15, 16, 17).

XII. 2.7. Testul de agregare a leucocitelor

Testul de agregare a leucocitelor (TAL) a fost elaborat în scopul determinării prezenţei şi intensităţii fenomenului de imunitate mediată celular la pacienţii supuşi unei operaţii de transplantare renală.

Principiul metodei se bazează pe aderarea leucocitelor primitorului la ce-

Scanned with OKEN Scanner

lule-ţintă ca urmare a recunoaşterii imune specifice a antigenelor de transplantare ale donatorului de către limfocitele T sensibilizate. După realizarea acestei etape, leucocitele sînt atrase la locul reacţiei şi formează conglomerate.

Metoda prezintă o serie de avantaje: realizare în cîteva ore, folosirea unei cantităţi reduse de sînge în vederea testării, specificitate ridicată.

Efectuarea testării. Se realizează culturi celulare de rinichi care, în urma incubării în atmosferă de bioxid de carbon, aderă la plăci. Ulterior, celulele sînt trecute în plăci cu godeuri unde se vor dezvolta în monostrat.

Sîngele primitorului este recoltat în tuburi separate cu heparină (pentru obţinerea leucocitelor) şi fără heparină (pentru obţinerea serului). Serurile sînt inactivate prin căldură înainte de a fi folosite în reacţie. Se separă leucocitele prin sedimentarea eritrocitelor şi se recoltează, se spală, se numără şi se adaugă la culturile de celule. Cînd serurile sînt testate pentru stabilirea prezenţei unor factori umorali care pot să modifice reactivitatea leucocitelor, probele sînt incubate în prealabil pe monostrat de celule renale.

În continuare, suspensia de leucocite se repartizează în godeuri pentru o perioadă de timp determinată, apoi sînt reluate şi trecute în godeuri libere pentru a se verifica dacă nu au proprietatea de a agrega spontan.

Rezultatele reacţiei sînt interpretate prin examinarea microscopică a culturilor la care s-au adăugat leucocitele primitorului.

Reacţia negativă se traduce prin existenţa unui număr redus de agregate leucocitare; în cazul reacţiei pozitive se constată prezenţa leucocitelor dispuse în numeroase aglomerări.

Aplicaţii. TAL s-a dovedit util în următoarele situaţii:

— decelarea stării de imunitate mediată celular la pacienţii cărora li s-au transplantat organe, faţă de antigenele tisulare ale organului transplantat;

— determinarea gradului de sensibilizare imună la nivel celular;

— stadiul receptorilor de suprafaţă ai celulelor de tip T implicaţi în reacţiile mediate celular faţă de determinanţii antigenelor principale de histocompatibilitate.

XII. 2.8. Autoradiografia

Autoradiografia este o metodă de detectare *in vivo* sau *in vitro* a substanţelor marcate radioactiv şi se bazează pe proprietăţile ce le au radiaţiile ionizante emise de acestea de a reduce bromura de argint din emulsiile fotografice. Primele studii de autoradiografie experimentală pe animale au fost efectuate de Lacassagne şi col. în 1924. Autorul a cercetat pe şobolan repartiţia în organism a poloniului şi a folosit pentru preparatele obţinute termenul de „autoradiografii" sau „historadiografii".

Această metodă în prezent are o largă aplicare în cele mai diverse domenii, iar în cercetarea medicală şi în special în imunologie, a permis analiza fenomenelor pînă la nivel molecular.

Principiul metodei. Metoda constă în detectarea şi măsurarea radioactivităţii antigenelor sau a anticorpilor marcaţi implicaţi în reacţii imune *in vitro* sau *in vivo*. Este o metodă fotochimică bazată pe acţiunea fotografică a radiaţiilor ionizante.

Variantele metodei. În funcţie de nivelul la care se face observaţia, se pot deosebi mai multe categorii de metode autoradiografice:

— macroradiografia folosită pentru studierea distribuirii substanţelor marcate în probe relativ mari cum sînt: animale de laborator, organe, ţesuturi sau cromatograme şi reacţii antigen-

Scanned with OKEN Scanner

anticorp în gel (arcuri de precipitare în metodele de imunodifuziune sau imunoelectroforeză);

— histoautoradiografia sau microautoradiografia care constă în detectarea substanţelor marcate cu izotopi în preparate histologice sau în frotiuri şi amprente, preparatele fiind examinate cu microscopul de lumină;

— histoautoradiografia electronică sau electronomicroautoradiografia, prin care se detectează substanţele marcate la nivel ultrastructural cu ajutorul microscopului electronic.

Materiale necesare. Radioizotopii radioactivi pentru marcarea în cazul autoradiografiei sînt în principiu cei folosiţi la marcarea anticorpilor. În general, în cercetări de imunochimie sînt folosiţi izotopi emiţători de radiaţii beta şi gamma. Pentru marcarea în cazul autoradiografiilor se pot utiliza radioizotopii iodului (^{125}I, ^{131}I), sulfului (^{35}S), carbonului (^{14}C), hidrogenului (^{3}H). Dintre aceştia, utilizarea mai largă o au radioizotopii iodului (^{131}I şi ^{125}I). Deşi dau autoradiografii cu o rezoluţie slabă ca urmare a capacităţii de ionizare reduse, izotopii radioactivi ai iodului prezintă o serie de avantaje (marcarea se face rapid, produsul marcat are o stabilitate *in vitro* etc.) şi datorită puterii mari de pătrundere se pot folosi cu rezultate bune în marcarea antigenelor şi anticorpilor.

— Materiale fotosensibile folosite în autoradiografii se găsesc în comerţ sub formă de: emulsii nucleare lichide (gel), emulsii în plăci cu suport, pelicule fără suport, plăci cu suport de sticlă şi gelatină (stripping film) sau sub formă de filme Roentgen (pentru macrofotografii).

Tehnica de executare. În principiu, constă în marcarea radioactivă *in vivo* sau *in vitro* a substanţelor de cercetat şi detectarea acestora prin autoradiografie aplicînd diferite tehnici, în funcţie de categoria de metode autoradiografice folosite (macroautoradiografie, histoautoradiografie sau electronomicroautoradiografie).

Metoda de marcare radioactivă a anticorpilor se bazează pe înlocuirea unui atom stabil, care există în mod natural în molecula substanţei de marcat (de ex., anticorpul) cu unul radioactiv şi se poate realiza pe două căi:

— marcarea internă sau „biosintetică", care constă în introducerea într-un sistem viu a unui precursor marcat, urmată de producere prin biosinteză a produsului marcat; în acest caz, un animal, microorganism sau celule în cultură sînt nutrite cu precursorul care poate fi reprezentat de diferiţi compuşi ca: a) aminoacizi sau hidrolizate proteice din alge marcate cu ^{14}C; b) aminoacizi sau hidrolizate din drojdia de bere marcate cu ^{35}S; c) aminoacizi marcaţi cu ^{3}H sau d) anticorpi marcaţi cu ^{32}P;

— marcarea externă, care constă în marcarea anticorpului după ce acesta a fost purificat. În acest caz, se folosesc două procedee: introducerea izotopului radioactiv în molecula anticorp prin intermediul unei substanţe organice (metodă directă) şi b) introducerea directă a izotopului în molecula de proteină a anticorpului printr-o reacţie de substituţie în reziduurile de aminoacizi.

În general, toţi radioizotopii folosiţi la marcarea anticorpilor pot fi detectaţi prin autoradiografie.

Detectarea prin autoradiografie a substanţelor marcate se poate realiza prin diferite tehnici, în funcţie de metoda utilizată şi anume:

În tehnologia histoautoradiografiei sau a microautoradiografiei, în principiu, se pot deosebi următorii timpi de lucru:

— fixarea preparatelor: în alegerea fixatorului trebuie să se ţină seama ca acesta să nu dizolve substanţa marcată din ţesut şi să nu distrugă structura morfologică a preparatelor. Se pot folosi diferite soluţii fixatoare ca tamponformol, formol-clorură de calciu, soluţie Bouin, soluţie Carnoy, lichid Orth, soluţie Zenker etc. În cazul frotiurilor sau culturilor celulare se recomandă

Scanned with OKEN Scanner

metanolul absolut, lichidul Carnoy, lichidul Bouin;

— secţionarea şi montarea preparatelor se face în principiu după tehnicile histologice curente, cu unele particularităţi. Grosimea secţiunilor depinde de energia radiaţiilor emise, deci de substanţa folosită în marcare, pentru a se obţine o rezoluţie fotografică corespunzătoare. Secţiunile se întind pe lame bine degresate şi se deparafinează prin tehnica histologică uzuală;

— aplicarea emulsiei sau a peliculelor nucleare se face după tehnicile corespunzătoare materialelor fotosensibile folosite. Timpul de expunere variază în funcţie de caracteristicile izotopului, grosimea preparatului, caracteristicile şi grosimea emulsiilor nucleare etc.;

— colorarea preparatelor este necesară pentru a se corela imaginea autoradiografică cu substratul celular. Colorarea se poate face fie înaintea aplicării emulsiei sau a filmului, fie ulterior după developare, folosind metode histologice diferite ca metoda cu hematoxilină-eozină Ehrlich, hematoxilină Mayer;

— developarea şi fixarea se fac după expirarea timpului de expunere. Preparatele sînt prelucrate în camera obscură, conform recomandărilor firmelor producătoare de materiale folosite pentru developare şi fixare;

— în cazul macroautoradiografiilor se procedează diferit, în funcţie de materialele de cercetat: organismul întreg, organe, ţesuturi sau cromatograme şi reacţii antigen-anticorp în gel de agar;

— dacă se cercetează prezenţa substanţelor marcate în organismul întreg (animale mici de laborator), prelucrarea constă în următoarele etape: congelarea animalelor sau a anumitor părţi din organism în zăpadă carbonică şi acetonă sau alte metode, secţionarea la 20 microni la —10° şi lipirea secţiunilor pe o lamelă de scotch. Montarea se face cu film tip roentgen. Se pot folosi şi alte variante tehnice care se bazează pe acelaşi principiu — congelarea şi secţionarea. După obţinerea secţiunilor, preparatele se prelucrează în general după aceeaşi tehnică, ca şi în cazul histoautoradiografiei.

— Pentru autoradiografia electroforezelor de zonă şi a precipitatelor în gel de agar sau agaroză (imunodifuzia în gel, imunoelectroforeza) au fost folosiţi pentru marcare diferiţi izotopi cum sînt: ^{14}C, ^{32}P, ^{35}S, ^{60}Co, ^{135}I şi ^{125}I, dintre aceştia utilizare mai largă o are ^{135}I, iar în ceea ce priveşte emulsiile fotografice se indică, de regulă, filme folosite în radiodiagnostic sau filme în plăci folosite în tehnica fotografică.

Plăcile cu dublă difuziune în agar sau imunoelectroforeză se prepară după tehnicile uzuale şi se recomandă ca agarul să fie bine uscat pe suportul de sticlă şi să fie autoradiografiate preparate necolorate.

Metoda de marcare cu izotopi radioactivi în cazul *imunoelectroforezei* este denumită şi radioimunelectroforeză şi este asemănătoare cu fluoroimunelectroforeza, deosebindu-se de aceasta prin faptul că marcarea este făcută cu un izotop radioactiv şi nu cu fluorocrom, iar identificarea reacţiei se face prin autoradiografie şi nu prin examen în spectru ultraviolet.

O metodă asemănătoare este *fluororadioimunoelectroforeza* în care antigenul sau anticorpul se marchează dublu şi anume cu izotop radioactiv şi cu fluorocrom, iar preparatul final se examinează atît în UV, cît şi autoradiografic.

— **Electronomicroautoradiografia** este în principiu tehnica autoradiografică, dar examinarea se face cu microscopul electronic. Această metodă permite detectarea şi localizarea substanţelor marcate la nivelul structurilor infracelulare, la o rezoluţie în jur de 0,1 microni. Metoda de pregătire a preparatului marcat este aceeaşi cu cea a materialului obţinut pentru microscopul electronic. Grilele se acoperă în prealabil cu o peliculă de carbon, celoidină sau film de colodiu care se metalizează. Secţiunile se

Scanned with OKEN Scanner

depun pe grile şi se acoperă cu emulsii. Se aleg în acest scop emulsii cu mărimea granulelor de argint pînă la 0,12 microni, iar revelatoarele şi fixatorii folosiţi în autoradiografia electronomicroscopică sînt diferiţi de cei folosiţi în autoradiografia obişnuită; aceştia trebuie să realizeze o developare cu granulaţie fină.

Interpretarea rezultatelor. Autoradiografia se foloseşte în general pentru evaluarea calitativă a substanţelor marcate, la nivelul organelor, ţesuturilor sau celulelor sau *in vitro* în reacţiile antigen-anticorp (metode bazate pe difuzia în gel de agar).

Interpretarea rezultatelor se bazează pe aprecierea gradului de înnegrire la diferite nivele ale organismului în cazul macroautoradiografiei sau pe prezenţa sau absenţa granulelor de argint în ţesuturi, celule sau nivelul intracelular în cazul histoautoradiogramelor şi autoradiografiei electronomicroscopice.

Prin autoradiografii se pot face şi evaluări cantitative prin două tipuri de determinări şi anume: determinarea proporţiei de celule marcate de către radioizotopi sau determinarea intensităţii marcării într-o singură celulă sau într-un grup de celule.

Aplicaţii. Autoradiografia are multiple aplicaţii în medicină în general şi în special în imunologie, unde a permis studiul fenomenelor pînă la nivel molecular. Astfel, se pot cerceta diverse aspecte privind: localizarea unor antigene sau haptene marcate în ţesuturi sau celulele implicate în răspunsul imun, localizarea şi modul de acţiune a anticorpilor marcaţi la nivel celular şi subcelular, distribuţia celulelor limfoide în organism, identificarea specifică cu anticorpi marcaţi a antigenelor microbiene şi identificarea prin difuzia în gel sau imunoelectroforeză.

Tehnologia fiind relativ destul de complexă, metoda nu poate fi utilizată decît la nivelul laboratoarelor specializate. Marcarea anticorpilor cu izotopi radioactivi, cît şi manipularea preparatelor se fac obligatoriu numai în laborator special amenajat, iar personalul care lucrează cu substanţe marcate radioactiv trebuie special instruit privind manipularea şi protecţia faţă de radiaţii nucleare.

XII. 3. Metode de evidenţiere a reacţiilor antigen-anticorp

XII. 3.1. Teste de imunodifuziune şi precipitare

Bazate în special pe lucrările efectuate de Oudin şi Ouchterlony, testele de imunodifuziune şi-au găsit o largă aplicabilitate în cercetările cu privire la structurile antigenice şi în mod deosebit în diagnosticul unor boli caracterizate prin biosinteza imunoglobulinelor specifice. Totodată, aceste teste şi-au dovedit utilitatea în decelarea unor antigene, în primul rînd a celor virale.

Principiul metodei se bazează pe realizarea reacţiilor antigen-anticorp în urma difuzării acestor doi reagenţi şi formării la locul întîlnirii lor a unor precipitate vizibile. Testele se realizează în medii semsolide de agar sau agaroză. (fig. 26).

Variante ale metodei. Testul de precipitare inelară reprezintă cea mai simplă tehnică din acest grup şi constă din formarea unui disc de precipitare la suprafaţa de contact dintre antigen şi antiser într-un tub cu diametrul de dimensiuni reduse.

Efectuînd testarea cu diluţii seriate de antigen şi de ser contra acestui antigen se poate cunoaşte raportul optim dintre cei doi reactanţi; acesta este reprezentat de acele concentraţii de antigen şi anticorp care dau reacţia

Scanned with OKEN Scanner

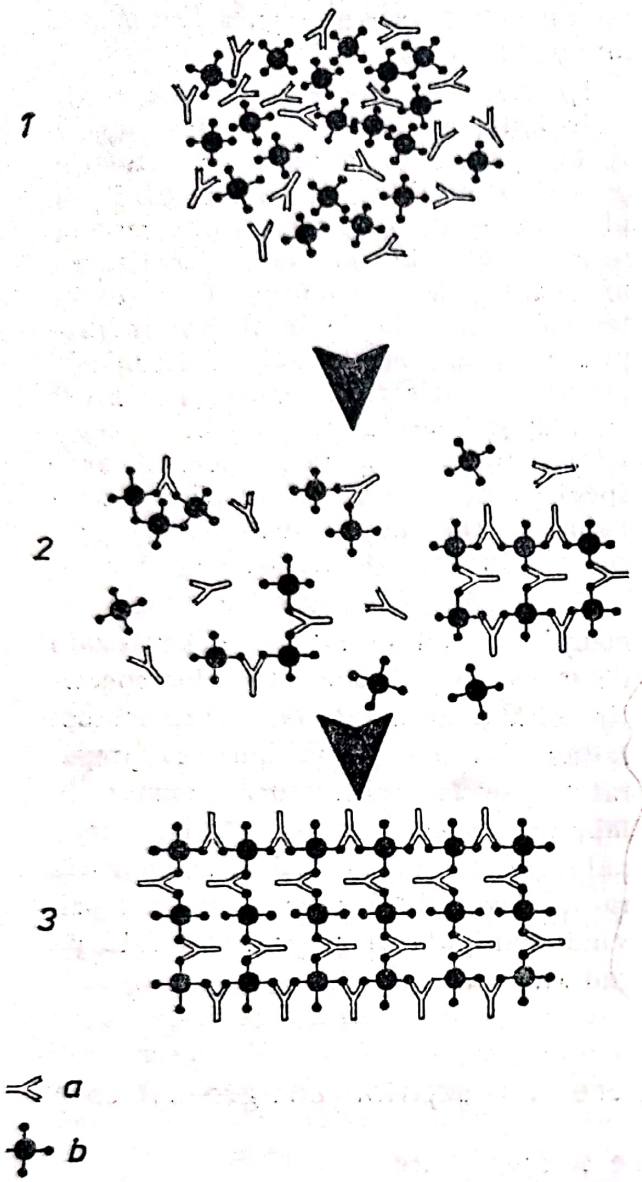


Fig. 26 — Mecanismul reacţiei de precipitare
1 — molecule de antigene şi anticorpi înainte de intrarea în reacţie; *2* — începerea procesului de cuplare antigen-anticorp; *3* — formarea reţelei de precipitare; *a* — anticorp; *b* — antigen

cea mai rapidă, mai clară şi mai intensă.

Testul de difuziune simplă în gel de agar se realizează în tuburi în care se repartizează, la baza acestora, serul incorporat în gel de agar. La suprafaţa acestuia se repartizează antigenul. După o perioadă cu durata variabilă, antigenul difuzează în agar şi formează împreună cu anticorpii corespondenţi mai multe linii de precipitare, în funcţie de numărul de complexe care se formează (fig. 27).

Testul de dublă difuziune constă din efectuarea precipitării în plăci cu gel de agar; godeuri de dimensiuni şi forme (în special circulare) variabile sînt practicate în mediul solid; în acestea se repartizează reactanţii — antigenul şi serurile cu imunoglobuline specifice — în condiţii care să asigure difuzarea lor şi formarea, în zona de întîlnire, a unor precipitate (linii, arcuri). Metoda permite evidenţierea mai multor antigene precum şi a identităţii dintre acestea (fig. XII 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, (foto XII 4, 5, 6).

Unii cercetători au aplicat o variantă a acestei metode constînd din repartizarea într-un godeu central a unui antiser cunoscut, bogat în anticorpi faţă de un virus a cărui prezenţă este cercetată; în godeurile laterale se repartizează omogenate tisulare în care se urmăreşte stabilirea prezenţei virusului respectiv. Formarea unei linii de precipitare, cu respectarea indiciului identităţii faţă de antigenul martor cunoscut, indică prezenţa virusului în ţesuturile cercetate. Testul de dublă difuziune în gel de agar prezintă o serie de avantaje faţă de alte metode serologice.

— existenţa unor concentraţii în exces de anticorpi sau de antigen nu influenţează negativ rezultatele, în măsura în care aceasta se întîmplă în cazul altor reacţii;

— condiţiile de realizare permit evidenţierea separată a diferitelor componente antigenice şi a anticorpilor corespondenţi, prin formarea mai multor linii de precipitare.

O variantă a testului se execută în aceleaşi condiţii ca şi cea clasică dar difuziunea reagenţilor se realizează într-un cîmp electric în condiţii care asigură întîlnirea imunoglobulinelor cu antigenul. În acest fel, tehnica permite identificarea anticorpilor sau a antigenelor necunoscute într-un timp mult mai scurt în comparaţie cu varianta clasică. Această metodă este cunoscută

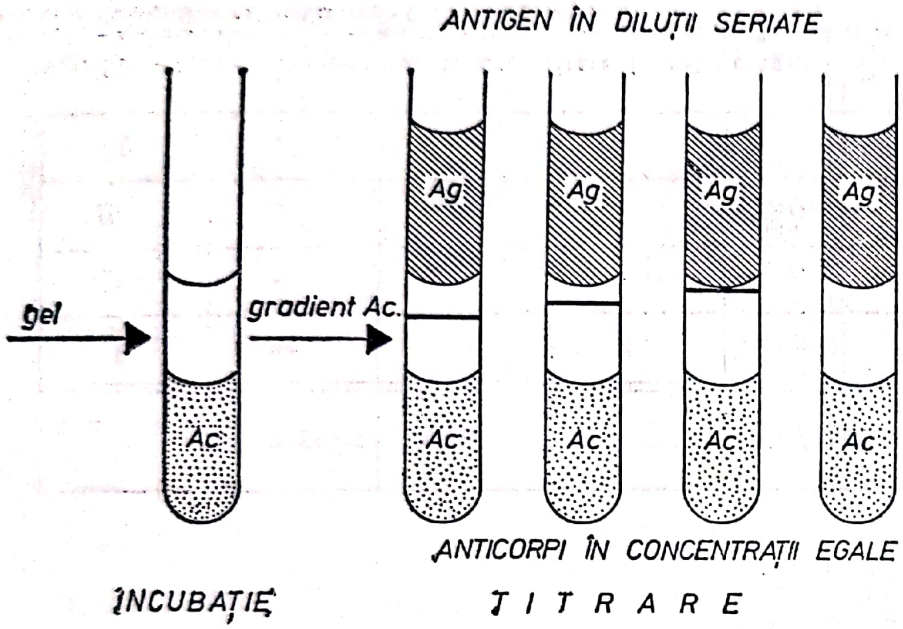


Fig. 27 — Tehnica determinării cantitative în tub (după O u c h t e r l o n y)

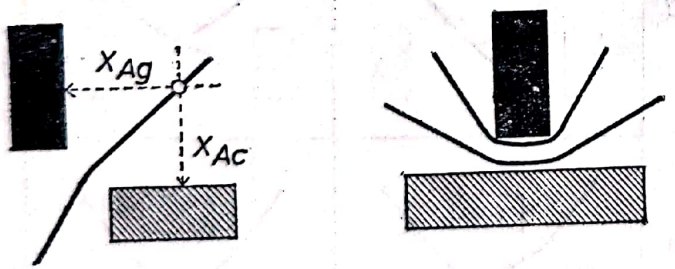


Fig. 29 — Tehnica reacției de dublă difuziune în gel de agar cu godeuri dreptunghiulare (După O u c h t e r l o n y)

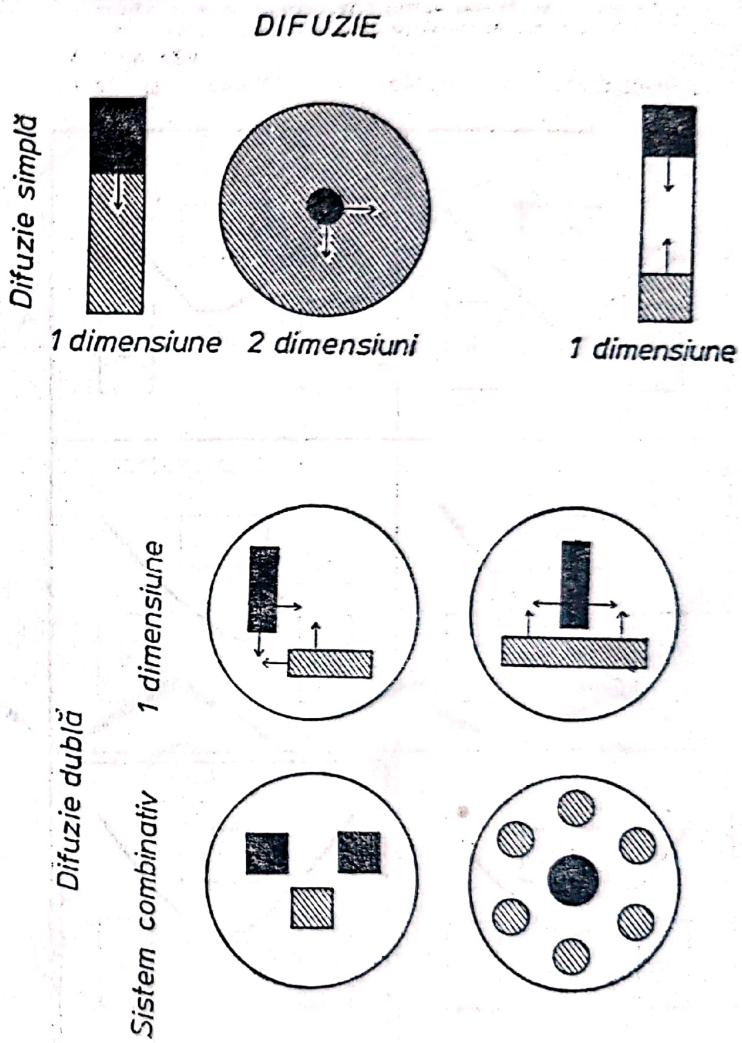
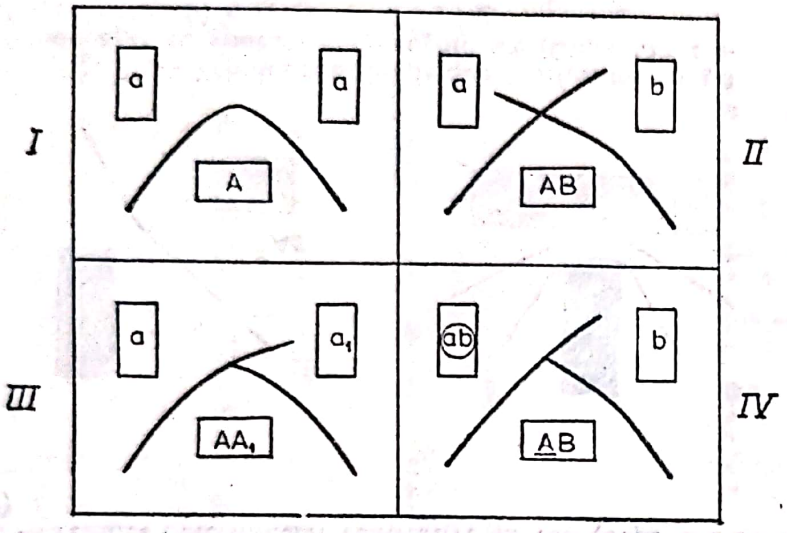


Fig. 28 — Modele ale reacției de imunodifuzie simplă și dublă în gel de agar (după O u c h t e r l o n y)

Scanned with OKEN Scanner



TIPUL REACȚIEI	INTERFERARE	INHIBITIE	DEVIAȚIE	FUZIUNE
I	da	nu	da	completă
II	nu	nu	nu	nu
III	da	nu	da	parțial
IV	da	da	nu	nu

Fig. 30 — Modele ale testului de precipitare în gel de agar
a, b — antigene neînrudite; a_1 — antigen înrudit cu antigenul *a*; *A*, *B* — anticorpi contra antigenelor neînrudite (după O u c h t e r l o n y)

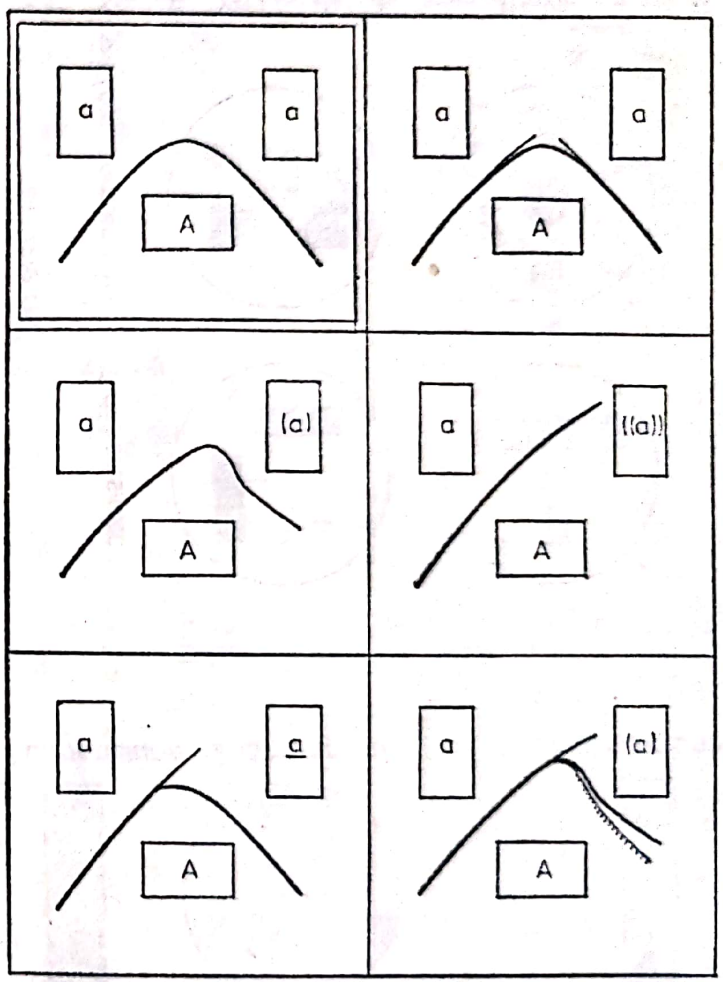


Fig. 31 — Modele ale reacției de precipitare în gel de agar
a — antigenul; (*a*) — antigenul *a* în concentrație redusă; ((*a*)) — antigenul a în concentrație foarte redusă; *A* — anticorp contra antigenului *a* (după O u c h t e r l o n y)

Scanned with OKEN Scanner

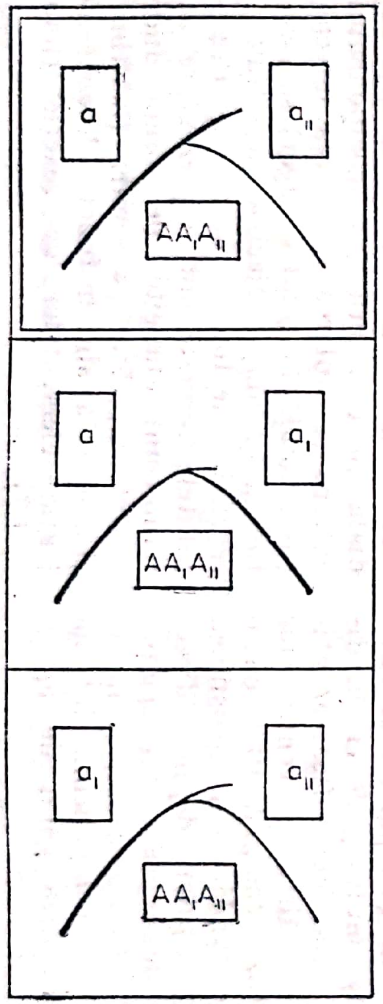


Fig. 32 — Reacţii de imunodifuziune în gel de agar între antigenele a—a, —a„ înrudite şi anticorpii A—A_I —A_{II} cu specificităţi diferite (după Ouchterlony)

Fig. 33 — Testul de imunodifuziune (după Ouchterlony) efectuat cu antigene neînrudite

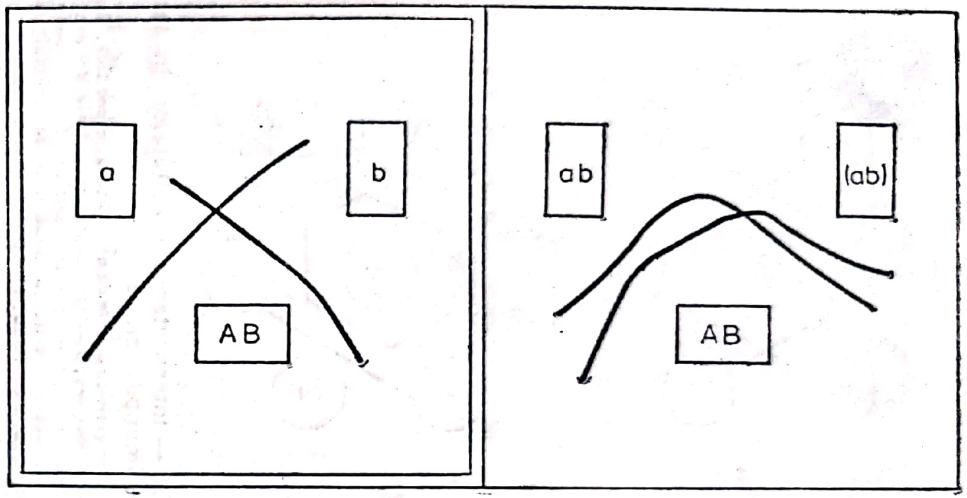
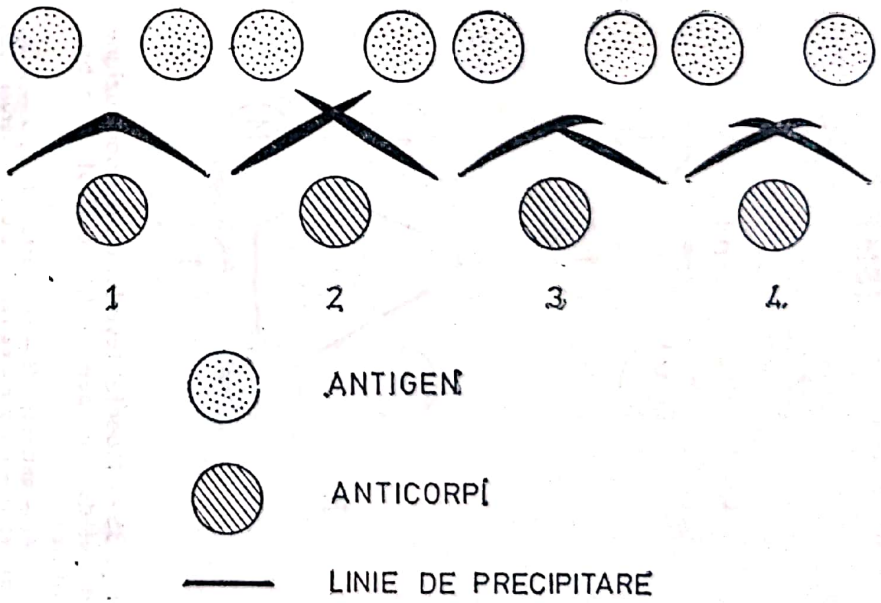


Fig. 34 — Schema testului de stabilire a identităţii prin imunodifuziune în gel de agar



Scanned with OKEN Scanner

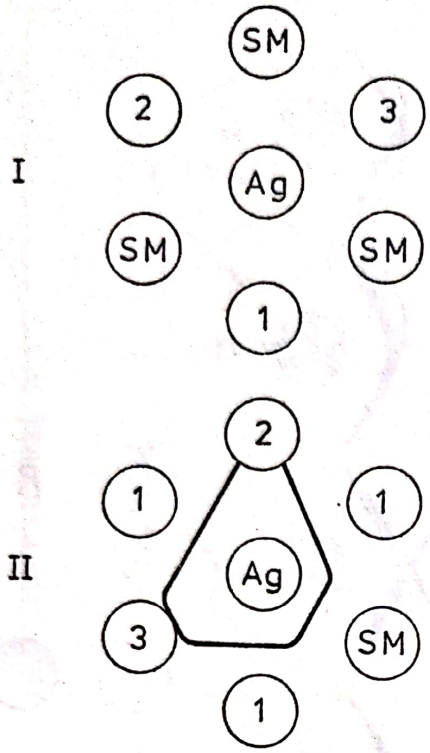


Fig. 35 — Modelul testului de imunodifuziune în gel de agar pentru diagnosticul unor boli virale

I — *Ag* — antigen; *SM* — ser martor; *1, 2, 3* — seruri testate; *II* — interpretarea rezultatului; *1* — seruri pozitive; *2* — ser negativ; *3* — ser slab pozitiv

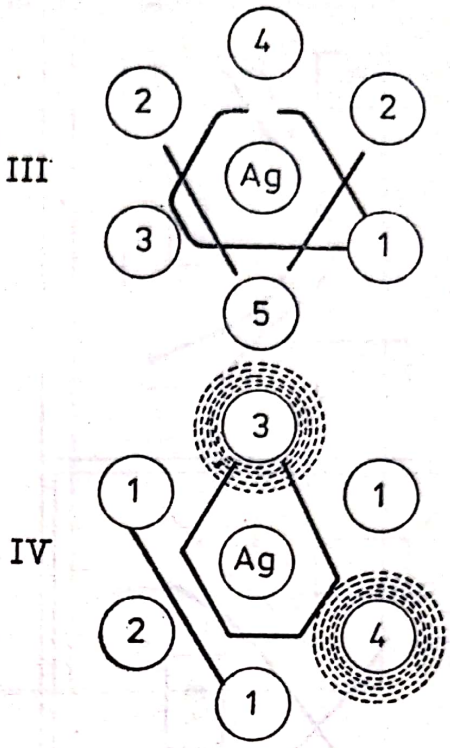


Fig. 36 — Interpretarea rezultatelor în testul de imunodifuziune

III 1 — ser negativ cu o linie de precipitare nespecifică; *2* și *5* — seruri pozitive; *3* — ser pozitiv cu o linie de precipitare nespecifică; *4* — ser intens pozitiv; IV. *1* — seruri pozitive; *2* — ser pozitiv cu două linii de precipitare; *3* — ser negativ cu halou; *4* — ser pozitiv cu halou

sub denumirea de *testul de imunoosmoforeză* sau de *imunoelectroprecipitare*.

Testul de imunodifuziune radială (metoda Mancini) se bazează pe o tehnică de difuziune simplă a unuia dintre reactanţi (antigenul sau anticorpul) în mediul de gel de agar care conţine înglobat celălalt reactant. În mod obişnuit, gelul include soluţia de anticorpi. Respectarea unor proporţii convenabile între imunoglobulinele specifice şi antigen precum şi repartizarea antigenului în mai multe godeuri, în diluţii seriate, permit cuantificarea antigenului şi stabilirea concentraţiilor optime pe baza comparaţiilor cu o curbă etalon-standard. Dimensiunea inelelor de precipitare depinde direct proporţional de concentraţia componentei externe (din godeuri) şi invers proporţional de componenta internă (cea incorporată în gelul de agar). (fig. 37).

Prin testul de imunodifuziune simplă radială nu se obţin rezultate corespunzătoare în cazul sistemelor care evidenţiază formarea mai multor sisteme antigen-anticorp. Unele deficienţe în executarea testului (ca de exemplu apropierea prea mare dintre godeurile succesive) determină de asemenea nereuşita titrării prin această metodă (foto XII 8).

Tehnica rachetei este o variantă a testului de imunodifuziune simplă radială în care migrarea componentei externe şi cuplarea sa cu cea internă (încorporată în gelul de agar) se efectuează în cîmpul electric care traversează lamele folosite la reacţie. Precipitatele formate sînt reprezentate de formaţiuni alungite, de forma unor rachete, ai căror parametri (înălţime şi suprafaţă) sînt în funcţie de concentraţia elementelor de reacţie (foto XII.7).

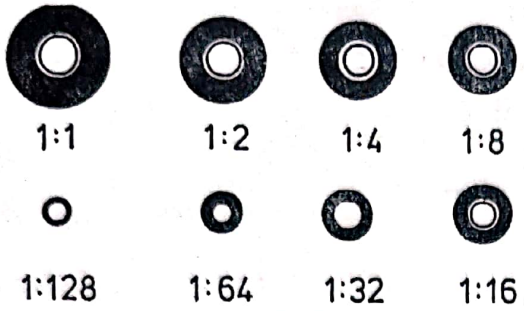


Fig. 37 — Schema testului de imunodifuziune radială

Testul de radioimunodifuziune se realizează printr-o metodologie asemănătoare celei de dublă imunodifuziune dar unul dintre reagenţi este marcat în prealabil cu un izotop radioactiv. În aceste condiţii, se formează precipitatul antigen-anticorp care poate fi pus în evidenţă prin metode radiobiologice. Metoda are avantajul unei sensibilităţi evident crescute faţă de procedeele clasice.

Testul de imunoelectroforeză reprezintă o combinaţie a electroforezei simple cu dubla difuziune. Metoda este aplicată în special în scopul determinării componentelor proteice din serul sanguin sau din alte lichide biologice. În prima etapă, are loc migrarea diferenţiată a componentelor proteice, determinată de curentul electric care este trecut prin lamele cu gel de agar sau agaroză. În a doua etapă, se practică în gel şanţuri, paralele cu direcţia migrării proteinelor, în care se repartizează un ser preparat prin hiperimunizare contra aceloraşi proteine (de exemplu contra proteinelor serice totale (fig. 38, 39, 40, foto XII.9, 10, 11).

Cel mai utilizat dintre testele prezentate este cel de *dublă imunodifuziune în gel de agar* care a cîştigat un loc important în cercetare şi diagnostic.

Materiale necesare: — mediul semisolid — gel de agar sau agaroză — şi tampoanele cele mai indicate, în funcţie de sistemul în lucru;

— plăci de sticlă sau material plastic;

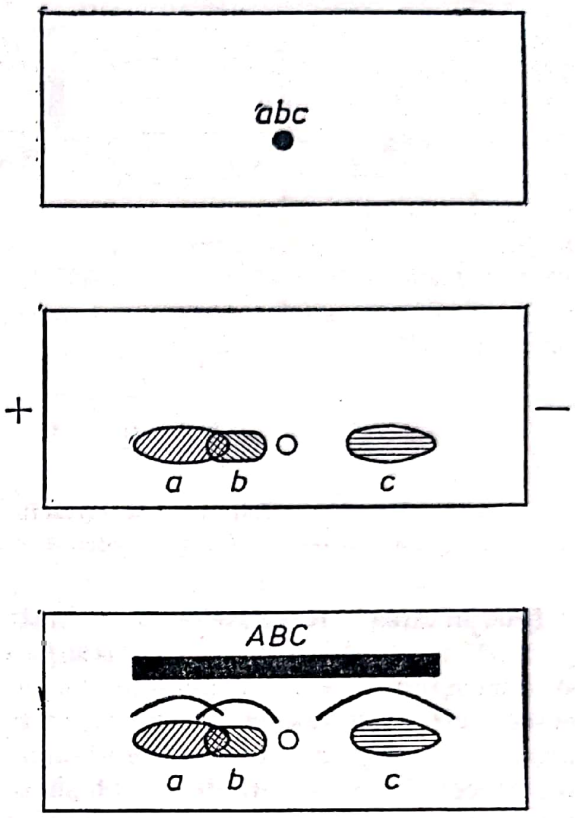


Fig. 38 — Testul de imunoelectroforeză
Modul de migrare electroforetică a antigenelor şi formarea liniilor de precipitare prin dublă imunodifuziune

— antigenul solubil sau reprezentat de o suspensie virală;

— seruri martor pozitive şi negative.

Efectuarea testului. După ce mediul gelifiat s-a răcit suficient în plăcile în care a fost repartizat, se practică godeuri după modelul ales, în funcţie de sistemul antigen-anticorp aflat în testare. Modelul cel mai utilizat este cel constituit dintr-un godeu central şi 6 godeuri exterioare acestuia (modelul hexagonal).

În godeul central, se repartizează antigenul; în trei godeuri alternate exterioare se repartizează serul martor pozitiv iar în celelalte trei seruri de cercetat.

După o perioadă de incubaţie, de obicei la temperatura camerei, se formează complexele antigen-anticorp, exteriorizate prin linii (arcuri), de lungime şi intensitate variabilă. Citirea acestora se realizează în condiţii mai bune prin examinarea în lumină oblică.

Scanned with OKEN Scanner

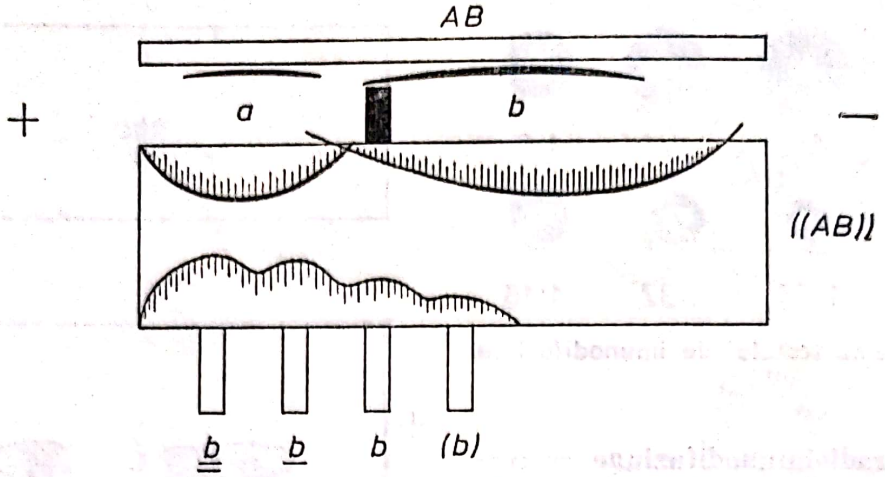


Fig. 39 — Tehnica precipitării în imunoelectroforeza cantitativă
A şi B — anticorpi contra antigenelor *a* şi *b*

Interpretarea rezultatelor obţinute prezintă unele dificultăţi care presupun o cunoaştere exactă a principiilor acestui test. Astfel, este necesar ca între arcul de precipitare din sistemul martor şi cel din sistemul de testat să se realizeze o continuitate care indică identitatea de structură antigenică. De asemenea, este necesar să se ţină seama de caracterele liniilor de precipitare nespecifice, ale celor slab pozitive şi ale celor intens pozitive.

Aplicaţii. Testele de imunodifuziune sînt aplicate, în măsură tot mai largă, în numeroase direcţii:

— *diagnosticul bolilor virale*, prin evidenţierea anticorpilor în seruri şi a virusurilor în organe (ţesuturi), în culturi celulare sau în culturi pe ouă embrionate etc. Cele mai cunoscute aplicaţii în acest sens sînt în diagnosticul anemiei infecţioase ecvine, leucozei enzootice bovine, bursitei infecţioase aviare, infecţiilor virale ale bovinelor (BVD, IBR, adenovirusuri etc.), bolii de Aleutine, laringotraheitei infecţioase etc. Testul a mai fost aplicat în diagnosticul pestei porcine, bolii de Newcastle, bolii lui Marek, bolii de Teschen, febrei aftoase etc.

Metodele de imunodifuziune au fost utilizate şi în scopul identificării unor virusuri ca cele ale difterovariolei aviare, pestei porcine clasice, pestei porcine africane, pestei bovine, turbării, bronşitei infecţioase etc.;

— *determinarea cantitativă a conţinutului în anticorpi* în serul sanguin sau în alte lichide organice;

— *determinarea cantitativă a concentraţiei unor antigene*, îndeosebi prin testul de imunodifuziune radială, con-

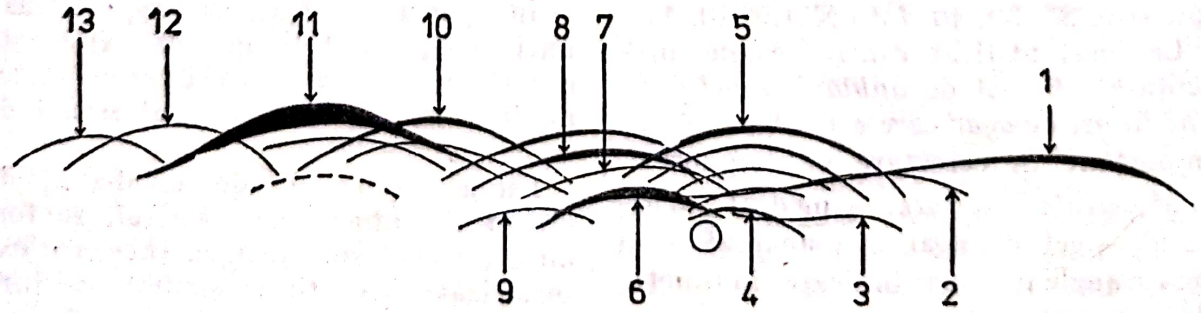


Fig. 40 — Imunoelectroforeza serului normal (reprezentare schematică)
1 — *IgG*; *2* — *IgA*; *3* — *IgM*; *4* — fibrinogen; *5* — transferină; *6* — alfa 2 macroglobulina; *7* — haptoglobulina; *8* — ceruloplasmin; *9* — alfa 2 lipoproteina; *10* — alfa 1 glicoproteina; *11* — albumina, *12* — *p* — *L*; *13* — *p*—*C* — *L*

fruntînd rezultatele obținute cu datele oferite de un etalon titrat în mai multe diluții;

— *evidențierea componentelor antigenice* existente în anumite produse, respectiv controlul purității unor antigene sau unor seruri monospecifice;

— *stabilirea gradului de înrudire antigenică*, a unor componente, aplicînd tehnica testului de identitate.

Testul de imunoelectroforeză, cu diversele sale variante, are largi utilizări în studiul structurii complexe a spectrului proteic din lichide organice cum este serul sanguin. Metoda permite evidențierea unor deficite imunologice (ca de exemplu hipo- și agammaglobulinemiile) precum și formarea unor componente serice patologice. În același timp, ea este deosebit de utilă în aprecierea gradului de purificare a componentelor imunoglobulinice prin aplicarea unor metode ca gelfiltrarea, cromatografia etc.

XII. 3.2. Reacțiile de neutralizare

Reacțiile de neutralizare se utilizează ca teste serologice atît în diagnostic, cît și în cercetări de laborator. În funcție de natura antigenului se pot împărți în mai multe categorii: reacții de neutralizare a toxinelor bacteriene; reacții de neutralizare a virusurilor; reacții de neutralizare a enzimelor.

A. **Reacțiile de neutralizare a toxinelor bacteriene** se practică în studiul exotoxinelor bacteriene cum sînt toxinele produse de *Corynebacterium diphteriae*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* etc. și în principiu se execută astfel:

— se pune în contact toxina cu serul care conține anticorpi antitoxici și se lasă amestecul la temperatura camerei sau la termostat, un timp variabil, timp necesar formării cuplului antigen-anticorp;

— se inoculează amestecul la animale de laborator sensibile față de toxina bacteriană examinată.

Reacțiile de neutralizare a toxinelor se utilizează pentru titrarea serurilor antitoxice, pentru identificarea unor specii bacteriene sau tipizarea tulpinilor bacteriene din cadrul speciilor toxigene (fig. 41).

Materialele necesare. Antigenul este reprezentat de supernatantul obținut după centrifugarea sau filtrarea unei culturi toxigene sau a suspensiei pre-

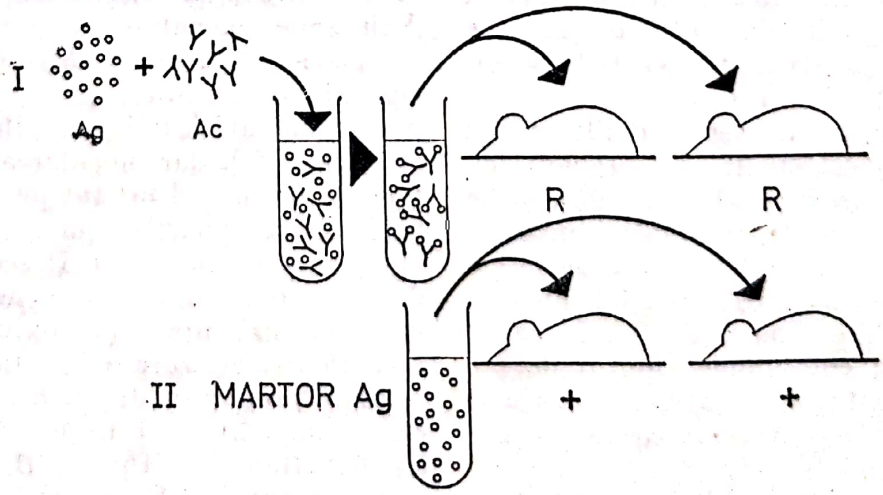


Fig. 41 — Schema seroneutralizării

I — animalele de experiență inoculate cu antigenul (toxină, virus) neutralizat prin anticorpi rezistă; II animalele din lotul martor mor în urma acțiunii patogene a antigenului

Scanned with OKEN Scanner

parate direct din materialul în care se urmăreşte decelarea prezenţei toxinei (conţinut intestinal, probe furaje etc.);

— serurile antitoxice specifice corespunzătoare antigenului de identificat preparate prin hiperimunizarea animalelor donatoare;

— animale de laborator: cobai, şoareci, în funcţie de receptivitatea acestora faţă de specia bacteriană luată în studiu.

Tehnicile. Deoarece în medicina veterinară reacţiile de seroneutralizare a toxinelor se aplică mai frecvent în identificarea unor bacterii toxigene cum sînt *C. perfringens*, *C. botulinum* sau tipizarea tulpinilor din cadrul acestor specii şi titrarea serurilor antitoxice respective, în continuare se vor prezenta în principiu tehnicile aplicate în studiul acestor germeni.

Identificarea tipurilor de C. perfringens. Tipurile de *C. perfringens* pot fi determinate prin proba de neutralizare a toxinei efectuată fie pe cobai prin inoculare intradermică (testul cutanat), fie pe şoareci inoculaţi intravenos.

Pentru testul cutanat pe cobai se procedează astfel: se amestecă proba (supernatant, filtrat cultură sau conţinut intestinal) suspectă, cu bulion nutritiv şi ser cu specificitate de biotip (A, B, C etc.); amestecurile se menţin 30 minute la temperatura camerei şi se inoculează intradermic la cobai în regiunea flancului (se impune o depilare prealabilă). Reacţiile se citesc după 24 şi 48 ore.

Pentru testul de seroneutralizare pe şoarece, amestecurile se prepară ca pentru testele cutanate pe cobai şi se inoculează cîte 0,3 ml intravenos la perechi de şoareci. Rezultatele se interpretează pe baza observaţiei animalelor inoculate pînă la 3 zile. În cazul cînd toxina corespunde tipului de ser utilizat pentru neutralizare, şoarecii rezistă, în caz contrar, moartea survine obişnuit în interval de 10 ore.

Identificarea toxinei botulinice se poate face în culturile izolate din materialul suspect sau direct din probele de alimente, furaje sau conţinut intestinal.

În cazul culturilor, toxina se obţine prin filtrarea culturilor în bulion cu carne, incubate timp de 5—10 zile la 30°C.

În cazul probelor de fecale sau furaje acestea se diluează în prealabil în soluţie fiziologică cloruro-sodică. Probele de furaje se lasă la macerat peste noapte, dacă permite timpul. Suspensiile obţinute se centrifughează pînă se obţine un lichid clar.

Înainte de a efectua proba de seroneutralizare, se testează toxicitatea supernatantelor obţinute pentru cobai sau şoareci, în funcţie de specia de animal de experienţă utilizat pentru proba de seroneutralizare. În cazul utilizării cobailor, inoculările se fac pe cale intraperitoneală şi se procedează astfel:

— se fac două loturi a cîte 2—3 cobai din care — un lot se inoculează cu supernatant testat pentru toxicitate; un lot se inoculează cu acelaşi supernatant dar încălzit în prealabil 10 minute la 100°C.

În cazul prezenţei toxinei botulinice confirmată prin moartea animalelor inoculate cu supernatantul neîncălzit, se determină tipul prin proba de seroneutralizare. În acest scop se amestecă un volum ser antitoxic de tip cu patru volume lichid de testat (neîncălzit) şi se inoculează intraperitoneal la cobai. Animalele inoculate cu amestecul de toxină şi antitoxină corespunzătoare tipului vor rezista.

În cazul utilizării şoarecilor, se procedează la fel, dar inocularea se face cu volume de 0,5—1 ml tot pe cale intraperitoneală. Apariţia, în interval de 3 zile, a unei paralizii flasce, urmată de moartea animalelor neprotejate, demonstrează prezenţa toxinei botulinice. Pentru tipizare se inoculează amestecurile preparate din lichidul de cercetat, dovedit a fi toxic, cu serurile antibotulinice de tip A, B, C, D, E şi rezultatul se interpretează în funcţie de serul de tip care a protejat şoarecele, acesta rezistînd toxinei respective.

Scanned with OKEN Scanner

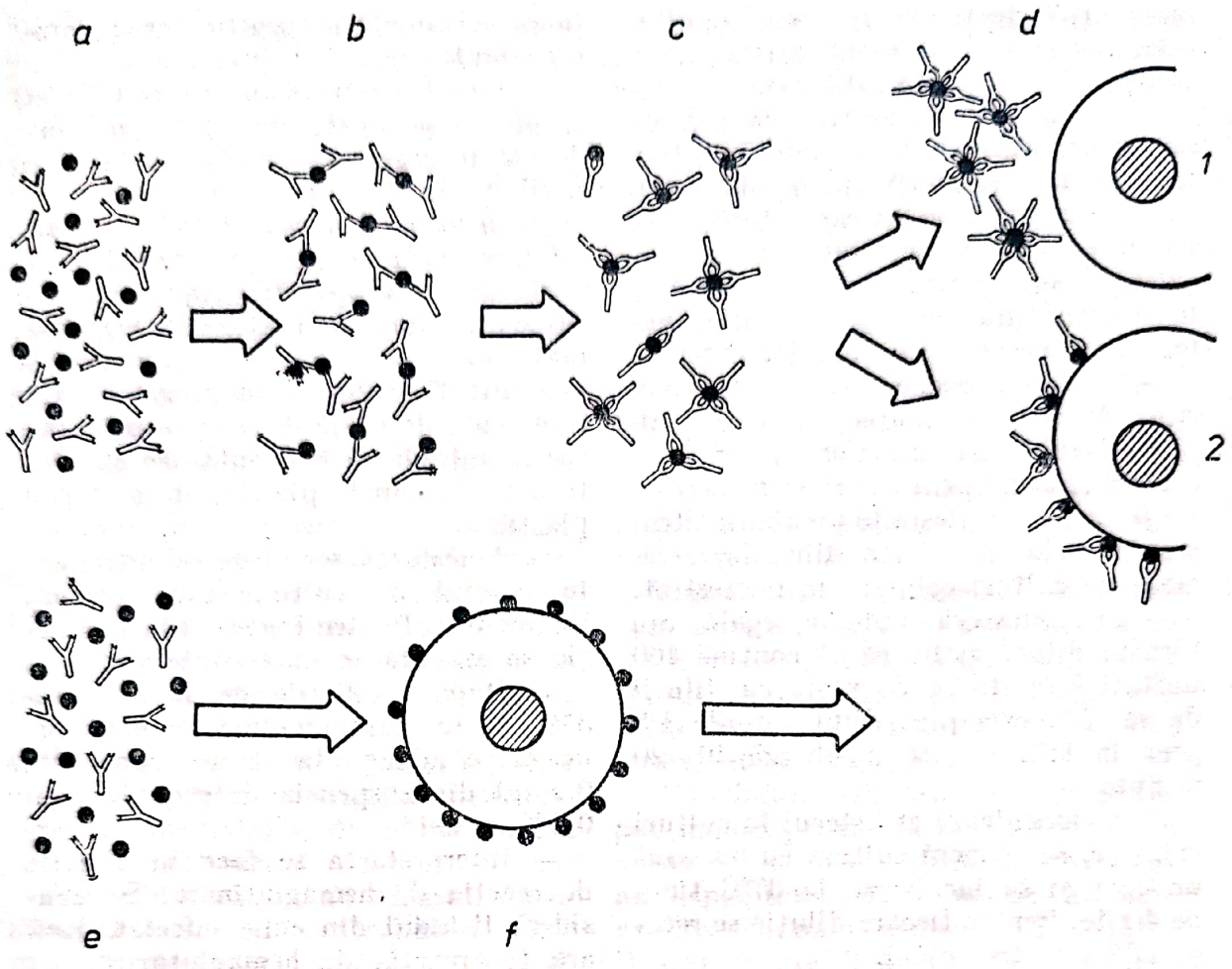


Fig. 42 — Reprezentarea schematică a testului de neutralizare

a — virus şi anticorp; *b* — cuplarea anticorpilor la particulele virale cu cîte un situs de combinare; *c* — cuplarea anticorpilor cu ambele situsuri de combinare; *d 1* — particule virale cuplate cu mai multe molecule de anticorpi = neutralizare totală, absenţa adsorbţiei şi a efectului citopatic; *d 2* — particule virale cuplate cu puţine molecule de anticorpi = neutralizare parţială, efect citopatic posibil; *e* — anticorpi heterologi şi *f* — absenţa neutralizării, pătrunderea virusului în celulă

B. **Reacţiile de neutralizare a virusurilor.** Reacţia de neutralizare a fost prima reacţie serologică utilizată în virusologie pentru detectarea anticorpilor din ser şi în prezent este considerată ca metodă de bază pentru determinările cantitative ale anticorpilor antivirali dintr-un ser sau pentru identificarea unei tulpini necunoscute de virus. Există numeroase tehnici şi variante prin care reacţia poate fi executată, toate avînd la bază acelaşi principiu — neutralizarea virusului prin anticorpii specificii introducînd în reacţie virus constant cu diluţii de ser (metoda beta) în cazul titrării serurilor, sau diluţii de virus cu ser constant (metoda alfa) în cazul identificării virusului. Deosebirile între diferitele tehnici constau în metoda utilizată pentru controlul prezenţei virusului în amestecul realizat, care se poate face prin inoculare pe diferite sisteme gazdă: ou embrionat, culturi celulare, animale receptive, folosind diferite variante tehnice (fig. 42).

Neutralizarea virusurilor controlată pe ouă embrionate. Se utilizează în prealabil virusul pe ou embrionat inoculînd diluţii zecimale din materialul virulent (de ex. lichid alantoamniotic) pe cale intraalantoidiană la cîte 5 embrioni. Titrul virusului se calculează în doze infectante ou (EID_{50}) pe mililitru. În

momentul efectuării reacţiei se diluează materialul virulent astfel ca să conţină 100 EID_{50} în 0,1 ml.

— Se fac diluţii seriate de ser, cu anticorpii antivirali, în soluţie salină tamponată (obişnuit prin dublare).

— Se adaugă la fiecare diluţie un volum egal din materialul virulent pregătit, se omogenizează bine şi se lasă la temperatura camerei 10—20 minute, timp necesar să aibă loc reacţia.

— Fiecare amestec virus-ser se inoculează intraalantoidian la embrioni.

Neutralizarea virusurilor controlată în culturi celulare prin testul de reducere a plajelor. Se stabileşte în prealabil titrul serului prin inocularea diluţiilor zecimale pe culturi celulare în monostrat.

— Se amestecă volume egale din virusul diluat astfel ca să conţină 100 unităţi formatoare de plaje cu diluţii de ser (de exemplu: diluţii duble 1:8 pînă la 1:128) şi se incubează 10—20 minute.

— Se inoculează amestecul în culturi celulare, se acoperă cultura cu un strat de agar şi se incubează la 37°C timp de 4 zile. Pentru fiecare diluţie se recomandă cîte trei plăci.

— După 72 ore cultura se colorează cu roşu neutru şi după 92 ore se numără plajele. O reducere a numărului unităţilor formatoare de plaje se consideră în general ca semnificativă.

Neutralizarea virusurilor în culturi celulare prin testul inhibiţiei metabolice. Se face amestecul de virus şi ser după tehnica descrisă mai sus.

— Se pregătesc culturi de celule în plăci din material plastic cu godeuri, în mediu nutritiv corespunzător care conţine şi un indicator de pH (roşu fenol).

— Se adaugă peste culturile din godeuri amestecurile virus-ser, folosind cîte trei cupe (godeuri) pentru fiecare diluţie; se incubează la 37°C.

— Interpretarea se face după culoarea mediului, ştiut fiind că producţia de acid de către celulele neinfectate modifică culoarea în galben. Indicatorul rămîne colorat în roşu în cupele în care celulele din cultură mor datorită multiplicării virusului.

— Titrul neutralizant al serului se stabileşte în funcţie de diluţia maximă de ser în care creşterea virusului este inhibată în 2—3 cupe.

Neutralizarea virusurilor în culturi celulare prin testul fragmentelor de coajă de ou (Egg bitt). Amestecul virus-ser se face după tehnica descrisă mai sus.

— Culturile celulare se pregătesc din fragmente de coajă de ou şi membrana corioalantoidiană aderentă de ele introduse în cupele plăcilor de material plastic.

— Amestecul ser-virus se introduce în mediul de cultură care acoperă fragmentul. Pentru fiecare diluţie reacţia se execută în mai multe cupe.

— După 1—2 zile de incubare la 37°C se scot fragmentele de coajă de ou şi se adaugă în fiecare cupă cîte 0,5 ml din suspensia de globule roşii 0,5%.

— Interpretarea se face în funcţie de reacţia de hemaglutinare. Se consideră lichidul din cupe infectat dacă are loc reacţia de hemaglutinare.

Neutralizarea virusurilor controlată prin testul de inhibare a efectului citopatic. Acest test poate fi aplicat numai în cazul virusurilor care produc efect citopatic în culturi celulare.

Conduita reacţiei, exemplificată prin tehnica aplicată la virusul febrei aftoase, este următoarea:

— Supernatantul obţinut după centrifugarea suspensiei de material patologic, se amestecă în eprubete separate cu volume egale din serurile de tip A, O, C (cîte o eprubetă de fiecare).

— Amestecurile se menţin la temperatura camerei timp de o oră pentru a avea loc cuplarea antigenului cu anticorpul.

— Din conţinutul fiecărei eprubete se repartizează cîte 0,2 ml în 5 tuburi cu monostraturi de culturi celulare primare de rinichi de porc. Se lasă monostratul celular acoperit cu ames-

Scanned with OKEN Scanner

tecul ser-virus timp de 1/2 oră şi apoi se înlocuieşte cu 2 ml mediu de întreţinere.

— Tuburile însămînţate se incubează la 37°C timp de 24—48 ore, interval după care se examinează microscopic aspectul culturilor cu obiectivul 30, pentru observarea eventualei apariţii a efectului citopatic.

— Interpretarea reacţiei se bazează pe prezenţa sau absenţa efectului citopatic, considerîndu-se pozitivă în eprubetele în care acesta nu s-a produs deoarece virusul a fost neutralizat prin anticorpi.

Neutralizarea virusurilor controlată prin infecţii experimentale pe animale. Controlul neutralizării virusurilor se poate efectua pe animale de experienţă, în funcţie de receptivitatea acestora faţă de virusul luat în studiu. Testul se execută în principiu după acelaşi protocol de lucru ca şi în cazul utilizării pentru controlul neutralizării a embrionilor de găină sau a culturilor celulare.

Exemplificînd tot cu virusul febrei aftoase, controlul neutralizării acestuia se efectuează astăzi în laboratoarele de specialitate şi pe şoareci sugari de 7—8 zile. Aceştia s-au dovedit sensibili la inocularea parenterală a virusului, manifestînd în decurs de 4—7 zile simptome nervoase caracteristice (S k i n n e r, 1951). Acelaşi autor introduce în 1954 şoarecele sugar ca animal test pentru identificarea tipurilor infectante de virus aftos pe baza decelării anticorpilor specifici în serul animalelor bolnave.

Pentru tipizarea virusului febrei aftoase direct din leziuni, pe şoareci sugari prin proba neutralizării, se procedează astfel:

— Materialul patologic (epiteliu lingual, gingival, coronar, pereţii aftelor, cît şi limfa din stadiul vezicular al leziunii) în cantitate de 1 g, mărunţit cu foarfeca, apoi mojarat în prezenţa nisipului de cuarţ, se diluează în tampon fosfat şi se menţine la temperatura de 2—4°C.

— Se centrifughează, supernatantul se decantează şi se sterilizează bacteriologic şi micologic prin adăugare de antibiotice.

— Paralel se repartizează serurile antiaftoase A, O şi C în cîte o eprubetă, la care se adaugă volume egale (0,6 ml) din supernatant.

— Amestecurile se lasă la temperatura camerei timp de o oră.

— Din fiecare amestec, cîte 0,2 ml se inoculează la cîte 5 şoareci. Animalele se ţin în observaţie pînă la 7 zile.

— Interpretarea se face în funcţie de serul de tip care a neutralizat infecţiozitatea virusului, animalele inoculate rezistînd.

Neutralizarea enzimelor bacteriene prin anticorpi a fost demonstrată de C o h n şi T o r r i a n i (1952) în cadrul cercetărilor privind proprietăţile beta-galactozidazei induse şi a proteinei Pz la *E. coli*.

Principiul. Proteinele enzimatice pot induce producţia de anticorpi precipitanţi şi neutralizanţi. Anticorpii au capacitatea de a neutraliza activitatea enzimei asupra substratului. Reacţia poate fi aplicată în bacteriologie pentru aprecierea calitativă şi cantitativă a unor enzime bacteriene.

Testul se efectuează punînd în contact enzima luată în studiu, cu anticorpii specifici; după menţinerea amestecului timp de 30 minute la 37°C sau temperatura camerei, acesta se centrifughează şi se determină activitatea enzimatică a supernatantului asupra substratului corespunzător enzimei cercetate. Rezultatul se compară cu activitatea enzimelor în amestecuri cu ser normal, cît şi cu globuline normale.

Material. Enzima se obţine prin metode de extracţie diferite, în funcţie de enzima luată în studiu.

Serul specific se prepară obişnuit pe iepure prin inoculări repetate, pe cale subcutană, urmate de inoculări intravenoase. Aşa de exemplu, o primă inoculare se face subcutanat cu 2 ml preparat enzimă în amestec cu adjuvant

Scanned with OKEN Scanner

Freund, iar după 4 săptămîni urmează 5 inoculări intravenoase la interval de o zi a cîte 0,5 ml preparat enzimă adsorbită. O metodă mai simplă poate consta în 6 inoculări intravenoase la interval de 3 zile a preparatului enzimă precipitat cu alaun

Tehnică şi interpretare. Reacţia se poate executa prin diferite variante tehnice, dintre care urmează a fi prezentate cele preconizate de Cohn şi Torriani (1952, 1953) şi Pollok (1956).

a) Testul de titrare al anticorpilor în diluţii seriate de ser în prezenţa unor cantităţi constante de antigen presupune următoarea conduită:

— Antigenul (enzimă purificată) se introduce în volume constante într-o serie de eprubete şi se adaugă ser imun în diluţii crescînde efectuate în soluţie salină tamponată.

— Amestecul se menţine 30 minute a temperatura camerei.

— Se determină activitatea enzimei libere (care nu a fost neutralizată prin anticorpi) prin metoda manometrică.

Titrul neutralizant al unei diluţii date de ser cu anticorpi poate fi calculat direct din panta porţiunii lineare a curbei de neutralizare.

b) Testul de absorbţie a anticorpilor constă în titrarea enzimei antigen în amestecuri cu cantităţi constante de anticorpi. În acest caz, se amestecă concentraţii variate de enzimă cu o cantitate constantă de ser cu anticorpi într-un titru cunoscut.

Amestecul se lasă la 35°C peste noapte şi se centrifughează. Se determină activitatea enzimei (prin metoda manometrică) din lichidul supernatant în paralel cu cea din precipitat.

Aplicaţii. Detectarea şi titrarea unor enzime bacteriene, mai ales a celor adaptative şi inductive.

XII. 3.3. Neutralizarea bacteriofagilor

După inocularea bacteriofagilor la animale, apar anticorpi specifici, neutralizanţi, fixatori de complement etc., datorită proprietăţilor antigenice ale proteinelor structurale ale capsidei bacteriofagilor.

Primele observaţii privind prezenţa unor astfel de anticorpi au fost făcute de Bordet şi Ciucă (1921) care au arătat că inocularea lizatelor fagice la iepuri stimulează producţia de anticorpi neutralizanţi.

Principiul. Se ştie că infecţia unei populaţii bacteriene sensibile cu un fag duce la liza bacteriilor. Punînd în contact bacterii indicatoare cu diluţii convenabile de fag şi etalînd apoi amestecul în plăci Petri cu geloză, după o incubare de 24 ore apar plaje, numărul acestora fiind în funcţie de numărul particulelor de fag (unităţi formatoare de PFU—plaque forming units).

Dacă se incubează în prealabil fagul cu diluţii seriate de ser antifag homolog, are loc neutralizarea fagului proporţională cu titrul anticorpilor din ser, care se traduce prin diminuarea numărului de plaje.

Materialele necesare. Preparatul fagic este filtratul unei culturi bacteriene sensibile lizată prin acţiunea fagului respectiv.

— Serul antifag se prepară pe iepuri prin inoculări repetate de preparat fagic folosind protocoale de hiperimunizare în funcţie de fag. Răducănescu şi Angelescu (1967) au obţinut pe iepure seruri specifice ale fagilor CAM (*cereus-anthracis-mycoides*), cu un titru neutralizant ridicat, aplicînd următorul protocol:

— inocularea unui lizat fagic pe cale subcutanată, urmată după o săptămînă de inocularea intravenoasă în doze de 5 ml conţinînd 1—800 x 16^6 PFU/ml;

Scanned with OKEN Scanner

— după un repaus de 30 zile, se reiau inoculările folosind aceleaşi doze; în total se fac 10—20 inoculări la interval de 3 zile;

— după 10 zile de la ultima inoculare, iepurii se sîngerează la alb.

— Medii de cultură uzuale: bulion, agar.

Tehnica. Se execută diluţii succesive de ser antifag 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} etc.

La fiecare diluţie de fag se adaugă o cantitate constantă de bacteriofag astfel diluat ca să permită obţinerea de plaje izolate.

După un contact de 5 minute la 37°C între bacteriofag şi ser, se întrerupe acţiunea neutralizantă a serului prin diluarea la 10^{-3} a fiecărui amestec fag-ser.

În fiecare tub, se adaugă tulpina bacteriană sensibilă faţă de fagul testat.

Conţinutul fiecărui tub se repartizează în plăci Petri în dublu strat de agar. După o incubaţie de 24 ore la temperatura camerei, se numără plajele din fiecare placă stabilindu-se astfel numărul de PFU, corespunzînd numărului de particule de fag rămase active, în comparaţie cu o placă martor fără ser, indicatoare pentru cantitatea de fag existentă la începutul reacţiei în fiecare diluţie.

Interpretarea rezultatelor. În vederea aprecierii activităţii neutralizante a serurilor se pot stabili următoarele valori:

— procentul fagilor neutralizaţi;

— valoarea neutralizantă a serului pe baza formulei propusă de A d a m s :

$$K = 2{,}3 \frac{D}{t} \left(\log \frac{Po}{P} \right)$$

în care:

K = constanta vitezei de neutralizare;

D = diluţia de ser care neutralizează fagul în proporţie de 90—99%;

t = timpul de contact între ser şi fag în minute;

Po = numărul iniţial de particule fagice (dat de numărul plajelor din placa martor)

p = numărul particulelor fagice la sfîrşitul reacţiei.

Autorul recomandă aplicarea formulei în cazurile cînd procentul particulelor neutralizate variază între 90% şi 99%.

Valoarea K, caracterizînd viteza reacţiei între ser şi fag, este indicatorul activităţii diferitelor seruri în cercetările efectuate cu acelaşi fag. De asemenea, permite prin neutralizare încrucişată, stabilirea înrudirilor antigenice între fagi.

Aplicaţii. Proba neutralizării este testul curent folosit pentru caracterizarea antigenică a bacteriofagilor.

XII. 3.4. Reacţia de inhibare a hemaglutinării

Reacţia de inhibare a hemaglutinării se bazează pe inactivarea prin anticorpi a activităţii biologice pe care o au unele microorganisme, în special virusuri, de a produce aglutinarea globulelor roşii. Capacitatea hemaglutinantă a virusurilor a fost observată pentru prima oară în 1941 de H i r s t care, lucrînd cu virusul gripal pe embrion de pasăre, a constatat că globulele roşii, extravazate în cursul recoltării embrionilor sînt aglutinate în contact cu lichidul alantoamniotic. Reacţia de hemaglutinare nu este însă specifică, deoarece mai multe virusuri (Ortho şi Paramyxovirusurile, unele Enterovirusuri etc.), cît şi unele bacterii (*Erysipelothrix rhusiopathiae*), *Mycoplasma gallisepticum* au acest efect asupra eritrocitelor. Dacă însă antigenul este pus în prealabil în contact cu antiserul specific, reacţia de hemaglutinare este inhibată şi nu mai are loc.

Inhibarea hemaglutinării este o reacţie specifică şi se utilizează fie pentru

Scanned with OKEN Scanner

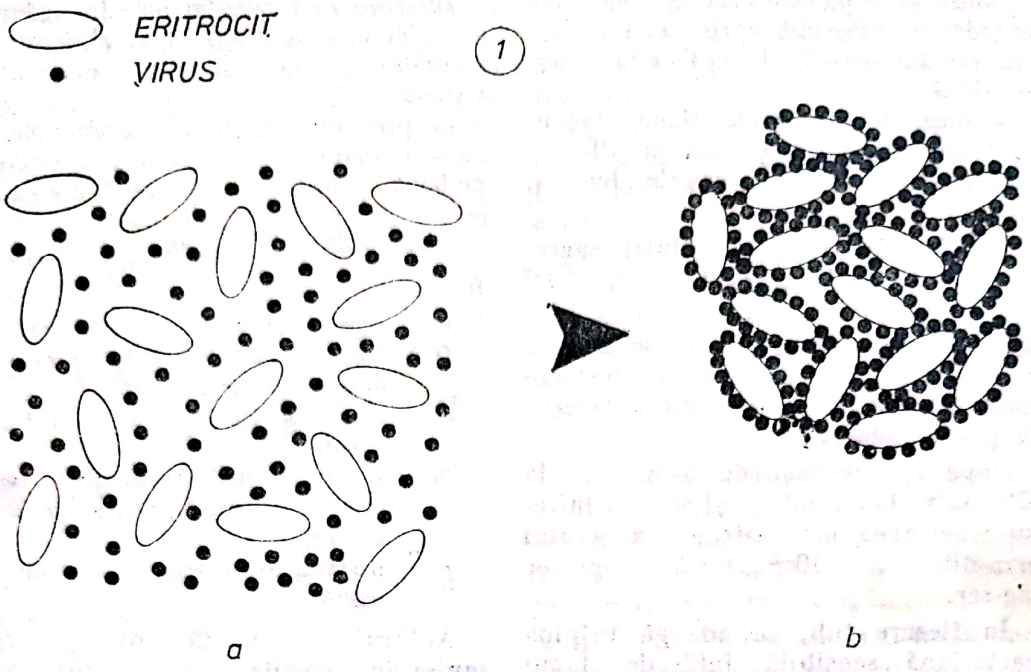


Fig. 43 — Testul de hemaglutinare
1 a — eritrocite şi virus; *1 b* — cuplarea virusului la eritrocite şi aglutinarea acestora

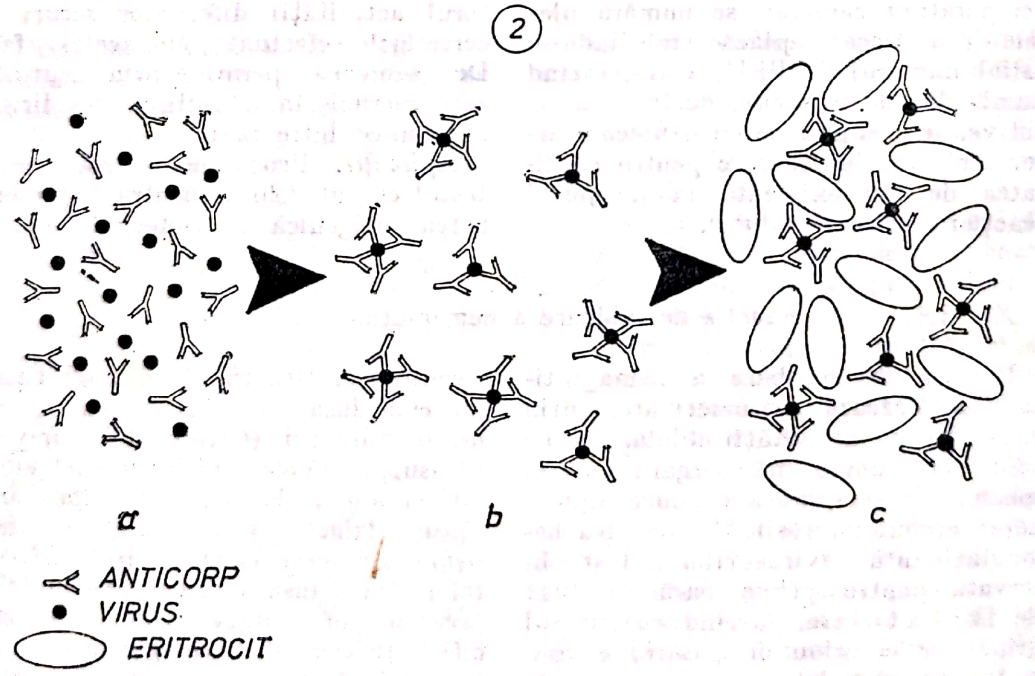


Fig. 44 — Reprezentarea testului de inhibare a hemaglutinării
2 a — amestecul virus-anticorpi; *2 b* — formarea complexelor virus-anticorpi; *2 c* — absenţa hemaglutinării în urma formării complexului virus-anticorpi

a identifica şi titra anticorpii din serul animalelor bolnave, vaccinate sau hiperimunizate, fie pentru a identifica antigenul izolat dintr-un material patologic.

Principiul reacţiei. Hemaglutininele, responsabile de activitatea hemaglutinantă a unor virusuri sau bacterii, se pot cupla cu anticorpii specifici (antivirali, antibacterieni) şi în consecinţă antigenele respective nu se mai adsorb pe suprafaţa globulelor roşii şi ca urmare activitatea lor hemaglutinantă este inhibată (fig. 43, 44).

Materialele. Globule roşii. Se pot utiliza globule roşii provenind de la diferite specii animale, în funcţie de capacitatea hemaglutinantă pe care o au virusurile sau bacteriile pentru care se aplică reacţia. În majoritatea cazurilor se folosesc eritrocitele de pasăre. Pentru prepararea suspensiei de globule roşii, sîngele se recoltează pe un anticoagulant (citrat de sodiu 3,8% sau soluţie Alsever). După centrifugare (3000 t/minut, timp de 5 minute), globulele roşii se spală de mai multe ori şi depozitul obţinut după ultima spălare se utilizează în reacţie în concentraţii diferite, de obicei 0,5%.

Antigenul. În cazul virusurilor se poate folosi lichid alantoamniotic dacă virusul este cultivabil pe embrion de găină, culturi celulare cu virus sau suspensii de organe recoltate de la cadavre cu infecţii naturale sau experimentale în care virusul se găseşte în cantitate mai mare.

În cazul organelor, după mojarare se suspendă 1:10 în soluţie fiziologică cloruro-sodică, se centrifughează 15 minute la 3000 t/minut şi se decantează supernatantul care este utilizat ca antigen.

Înainte de efectuarea reacţiei se determină titrul hemaglutinant al antigenului prin reacţia de hemaglutinare, punînd în contact antigenul în diluţii seriate duble 1/10, 1/20 etc. (în volume de 0,5 ml sau 0,25 ml), cu suspensie de globule roşii (0,5% în volum de 0,5 ml). Reacţia se poate efectua în tuburi sau godeurile plăcilor de material plastic pentru microreacţii. Titrul este reprezentat de diluţia maximă care a produs hemaglutinarea completă a globulelor roşii, se consideră că diluţia respectivă conţine o unitate hemaglutinantă.

Serul specific. Se obţine de la animalele bolnave sau imunizate cu antigenul hemaglutinant.

Tehnica. Reacţia se utilizează mai frecvent pentru titrarea anticorpilor din ser şi în acest scop se poate folosi una din următoarele variante tehnice: fie se introduc în reacţie virus-constant şi diluţii de ser (metoda beta), fie ser în volum constant se amestecă cu diluţii progresive de virus (metoda alfa).

În efectuarea reacţiei se pot deosebi în principal două etape: în prima etapă se pune în contact antigenul cu anticorpul şi în etapa a doua se adaugă suspensia de eritrocite.

În cazul metodei beta (virus-constant, ser diluat) care are o utilizare mai largă mai ales pentru titrarea serurilor, se procedează astfel:

Prepararea antigenului: prin diluarea virusului ţinînd seama de titrul hemaglutinant stabilit în aşa fel ca volumul de lucru să conţină două, patru sau mai multe unităţi hemaglutinante. Pentru a afla diluţia de lucru se împarte titrul antigenului stabilit în prealabil, la numărul unităţilor prevăzute în protocol pentru a fi introduse în reacţie. De exemplu, dacă se folosesc 2 unităţi hemaglutinante şi titrul hemaglutinant al antigenului este 640, înseamnă că antigenul va fi diluat 1:320 (640:2 unităţi hemaglutinante).

Se execută diluţii seriate de ser în soluţie fiziologică.

Se adaugă un volum constant de antigen diluat conform criteriilor menţionate.

Se lasă la temperatura camerei timp de 30 minute. Pentru unele virusuri temperatura optimă este 4°C

Scanned with OKEN Scanner

sau 37°C. În cazul temperaturilor joase se prelungeşte timpul de incubare la 24 ore.

Etapa a II-a. Se adaugă suspensia de globule roşii în acelaşi volum în toate tuburile sau godeurile.

Reacţia se efectuează cu martor ser pozitiv şi negativ.

Interpretarea reacţiei. Citirea reacţiei se face după 1—1 1/2 ore şi rezultatul se interpretează în funcţie de aspectul depozitului de globule roşii din tuburi sau cupe în cazul plăcilor de material plastic.

În cazul aglutinării, globulele roşii formează un depozit fin, granular, umbreliform, care acoperă fundul eprubetei. În cazul absenţei aglutinării, globulele roşii neaglutinate formează un depozit dens, neted, cu margini regulate, bine circumscrise, situate în punctul cel mai decliv al tubului. Reacţia de inhibare a hemaglutinării se consideră pozitivă cînd aglutinarea nu a avut loc.

Titrul inhibant al hemaglutinării se calculează în funcţie de diluţia maximă în care hemaglutinarea este complet inhibată şi anume, se înmulţeşte diluţia serului din tubul în care hemaglutinarea este inhibată cu unităţile hemaglutinante folosite în test. De exemplu, dacă s-au utilizat 10 unităţi hemaglutinate de antigen, iar diluţia maximă de ser care a inhibat hemaglutinarea a fost 1:20, titrul hemaglutinant va fi:

titrul serului x numărul unităţi HA = titrul HI

$$20 \times 10 = 200.$$

Aplicaţii. Reacţia de inhibare a hemaglutinării se utilizează pentru titrarea serurilor antivirale, identificarea anticorpilor în scop de diagnostic în serul animalelor bolnave şi identificarea virusurilor hemaglutinante ca virusurile influenţelor, virusul bolii Newcastle, reovirusurile, unele enterovirusuri. În medicina veterinară, reacţia se practică mai frecvent pentru diagnosticul psudopestei aviare.

XII. 3.5. Testul de hemaglutinare pasivă (indirectă)

Koegh şi col. (1948) lucrînd cu extractele unor tulpini de *Haemophilus influenzae* de tip B, constată că acestea conţin o substanţă adsorbabilă pe eritrocite şi că celulele tratate cu astfel de extracte sînt aglutinate de serul specific de tip. În prezent, acest tip de aglutinare, denumită hemaglutinare pasivă, are o largă utilizare întrucît permite evidenţierea antigenelor bacteriene solubile care dau reacţii vizibile cu anticorpii specifici numai dacă se adsorb în prealabil pe suprafaţa unor celule cum sînt globulele roşii sau pe particule inerte ca bentonita sau latexul, acestea servind drept suport pentru antigenele respective.

Principiul metodei. Metoda constă în fixarea directă sau prin intermediul altor substanţe a antigenului pe suprafaţa globulelor roşii şi aglutinarea acestora în urma contactului cu serul specific antigenului adsorbant (fig. 45).

Reacţia de hemaglutinare pasivă se aplică mai mult pentru decelarea anticorpilor specifici dintr-un ser folosind antigene adsorbite pe globule roşii şi mai rar ca test invers, pentru identificarea antigenelor prin anticorpii adsorbiţi pe suprafaţa eritrocitelor.

Unele antigene solubile ca polizaharidele se adsorb direct pe suprafaţa globulelor roşii, în timp ce antigenele de natură proteică se adsorb pe eritrocite în prealabil tanate, sensibilitatea testului fiind astfel amplificată.

Fixarea antigenelor pe suprafaţa globulelor roşii se poate realiza pe trei căi:

— adsorbţia directă a antigenelor da-

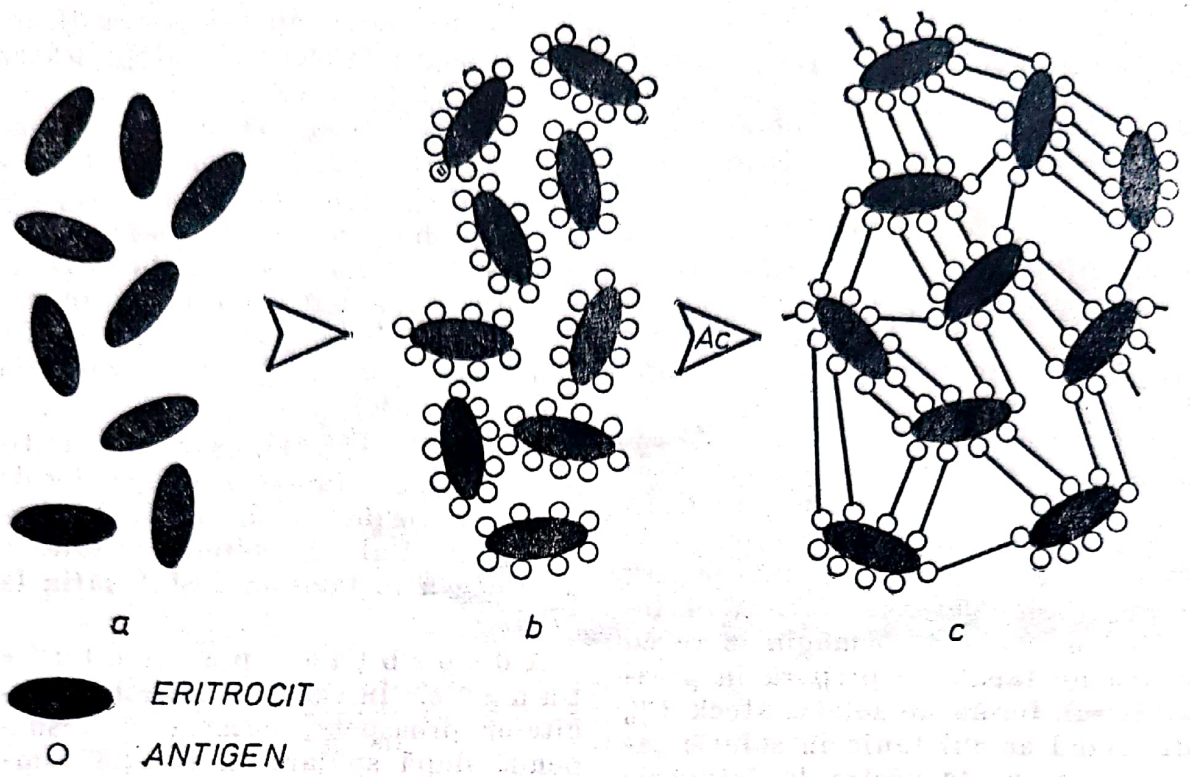


Fig. 45 — Mecanismul reacţiei de hemaglutinare pasivă
a — eritrocite; *b* — cuplarea antigenului la suprafaţa eritrocitelor; *Ac* — adăugarea anticorpilor; *c* — formarea reţelelor şi aglutinarea

torită unei afinităţi naturale a acestora pentru suprafaţa eritrocitelor;

— fixarea după prealabila tratare a globulelor roşii cu acid tanic (globule roşii tanate);

— fixarea antigenelor pe suprafaţa globulelor roşii prin intermediul unor substanţe chimice (metoda chimică).

Indiferent de metoda de fixare a antigenului pe suprafaţa globulelor roşii, reacţia în sine se execută după metoda de aglutinare lentă (directă) în tuburi sau în plăci de material plastic. Se fac diluţii seriate de ser, după care se adaugă antigenul fixat pe globule roşii. Interpretarea are la bază prezenţa aglutinării sau absenţa aglutinării globulelor roşii.

Materiale. Globule roşii. Se pot folosi globule roşii de la orice specie animală, dar rezultate mai bune se obţin cu hematiile de oaie. Unii autori recomandă utilizarea globulelor roşii de la aceeaşi specie de la care provine serul care se testează, dar în acest caz, înainte de efectuarea reacţiei, este necesar să se adsoarbă aglutininele pentru globule roşii care pot să existe în mod natural.

Globulele roşii se obţin din sînge proaspăt defibrinat sau recoltat pe soluţie anticoagulantă. Se spală de mai multe ori cu soluţie tampon fosfat salin. Nu se foloseşte sîngele hemolizat.

Globulele roşii se pot conserva prin tratare cu formol prin tehnici diferite. În metoda propusă de Daniel şi col. (1963) se procedează astfel: eritrocitele proaspăt spălate se amestecă cu formaldehidă 3% rece, se agită uşor sau se lasă la 4°C timp de 24 ore. Se adaugă apoi formaldehidă 40% rece şi agitarea se continuă 24 ore. Se filtrează apoi prin tifon, se spală cu soluţie salină şi se resuspendă în 6—8 volume soluţie salină. Celulele se pot conserva la frigider sau după o puternică agitare se congelează la —20°C sau se liofilizează. Astfel, se pot utiliza mai multe luni. Globule-

le roşii conservate în acest mod sînt de culoare maronie şi rezistente la congelare, liofilizare.

Fixarea antigenului pe globule roşii tanate se face în momentul efectuării reacţiei.

— Antigenul se prepară din bacteriile care interesează să fie introduse în reacţie. Se pot utiliza antigene de natură polizaharidică, proteică, purificate prin metode adecvate. Antigenele a căror structură este predominant polizaharidică se pot adsorbi direct pe eritrocite normale. Antigenele de natură proteică se adsorb mai bine pe globule roşii tanate.

— Acid tanic necesar pentru tratarea globulelor roşii în cazul folosirii metodei de hemaglutinare cu eritrocite tanate se prepară în prealabil sub forma de soluţie stock 1% dizolvînd acidul tanic în soluţie salină şi se poate păstra la întuneric la 4°C timp de o lună (dacă se tulbură sau se decolorează devine improprie). Din aceasta se prepară soluţii proaspete în momentul efectuării reacţiei, diluînd o parte soluţie stock cu 199 părţi soluţie tampon salină.

— Antiserul, în diluţii seriate în ser normal de iepure substituibil printr-unul din următoarele îngrediente diluate în acelaşi tampon: serumalbumină bovină, gammaglobulină de iepure. Se preferă serul de iepure deoarece ceilalţi diluanţi produc uneori aglutinarea spontană a eritrocitelor. Serul de iepure se inactivează la 56°C timp de 30 minute. Aceşti reagenţi se adsorb în prealabil pe globule roşii spălate pentru a îndepărta anticorpii care produc hemaglutinare spontană. În acest scop, serul nediluat se amestecă cu un volum egal de eritrocite, celulele se sedimentează prin centrifugare, serul se decantează şi se stochează la —20°C. Se diluează în momentul utilizării.

Tehnica. În efectuarea reacţiei se pot deosebi două etape de lucru:

— adsorbţia antigenului pe globule roşii;

— aglutinarea globulelor roşii de către serul specific corespunzător antigenului adsorbit.

Tehnicile de adsorbţie a antigenului diferă în funcţie de metoda folosită pentru ataşarea (fixarea) antigenelor pe globule roşii care poate să fie: adsorbţie simplă, care constă în fixarea directă a antigenului pe suprafaţa globulelor; adsorbţia pe celule tanate; ataşare pe globule roşii prin agenţi chimici.

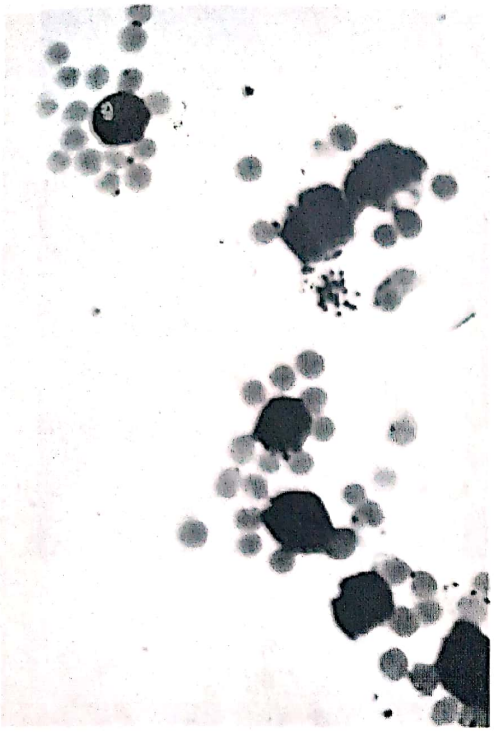
Adsorbţia simplă, care se utilizează mai ales în cazul antigenelor de natură polizaharidică, constă în simplul contact al eritrocitelor cu soluţia de antigen în tampon fosfat salin la 37°C.

Adsorbţia pe celule tanate. În cazul utilizării eritrocitelor proaspete, acestea se resuspendă după spălare în soluţie tampon fosfat în concentraţie finală de 2,5%. Un volum din suspensia de globule roşii se amestecă cu un volum egal de acid tanic soluţie 0,0005% şi se incubează la 37°C. Celulele se spală apoi cu un volum tampon fosfat şi se resuspendă în 5 volume soluţie tampon fosfat salin.

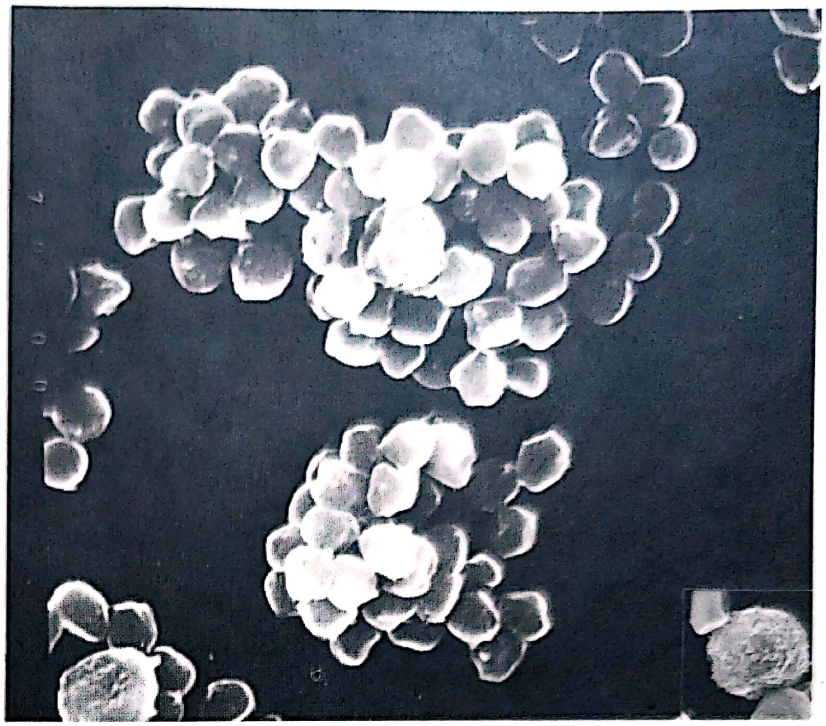
După tratarea cu acid tanic, pentru ataşarea antigenului pe suprafaţa globulelor roşii proaspete tanate se procedează astfel: un volum de antigen, în concentraţie stabilită în prealabil, se adaugă la suspensia de globule roşii. Amestecul se incubează 30 minute la temperatura camerei. Globulele roşii se separă prin centrifugare, se spală apoi în două volume tampon fosfat cu 1% ser iepure. Astfel pregătite şi păstrate la 4°C, globulele roşii tanate se pot utiliza în reacţia de hemaglutinare timp de 2—3 zile.

În cazul folosirii globulelor roşii formolate, se procedează astfel: celulele formolate şi congelate se agită viguros pentru dispersie, se spală de patru ori şi se resuspendă în volum convenabil de soluţie salină astfel, ca diluţia finală să fie 2,5%.

Scanned with OKEN Scanner

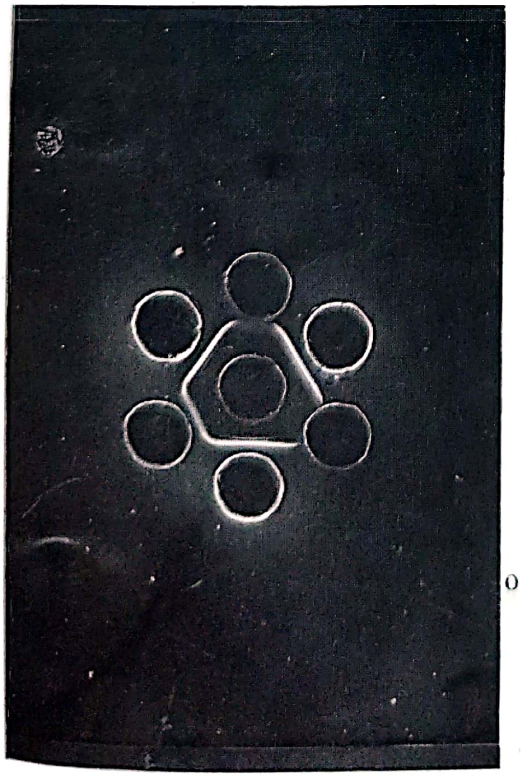


XII — Foto 1 — Testul de rozetare imună aplicat la limfocitele de tip B bovine (P ă u n e s c u și col.)

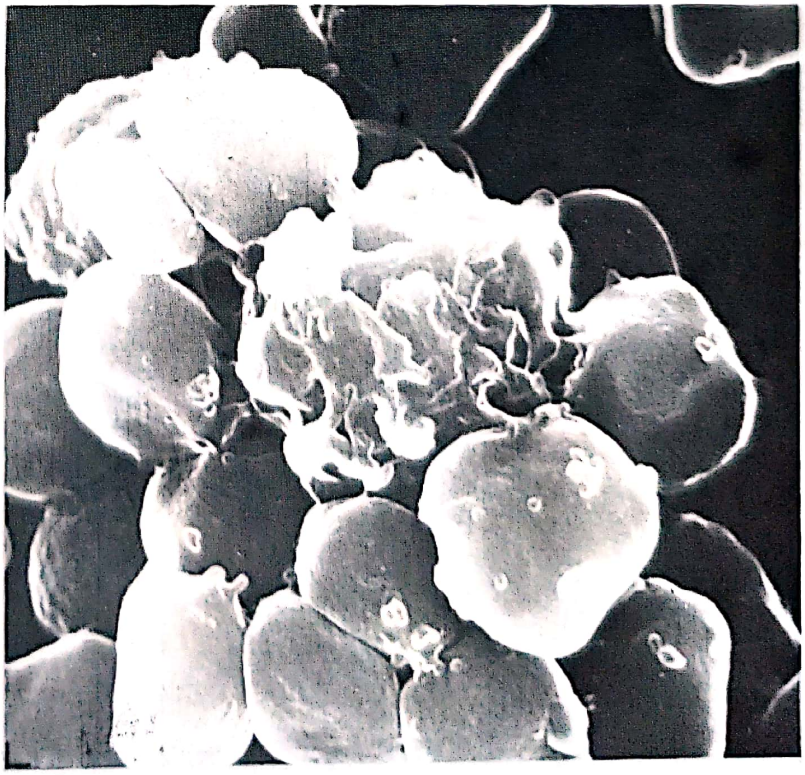


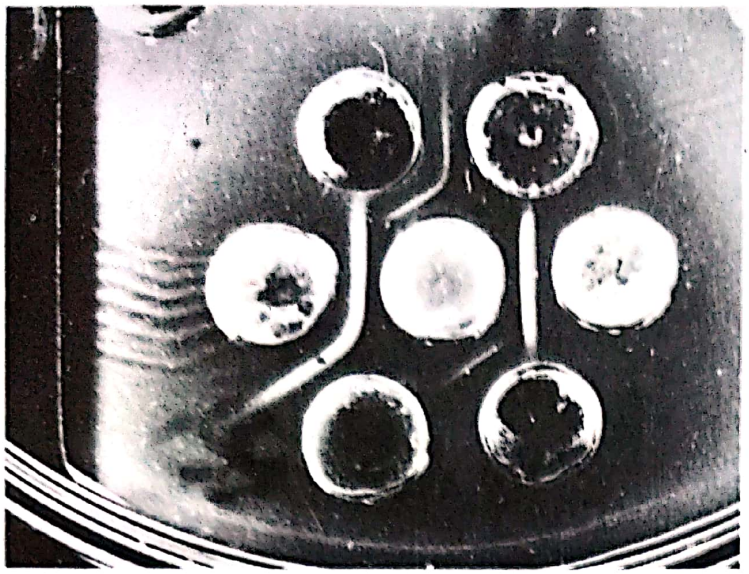
XII — Foto 2 — Testul de rozetare imună aplicat la limfocitele de tip B bovine; imagine electromicroscopică în scanning (P ă u n e s c u și col.)

XII — Foto 4 — Testul de dublă difuziune în gel de agar, cu evidențierea serurilor pozitive, a unui ser slab pozitiv și a unui ser negativ (Ț e ț u).



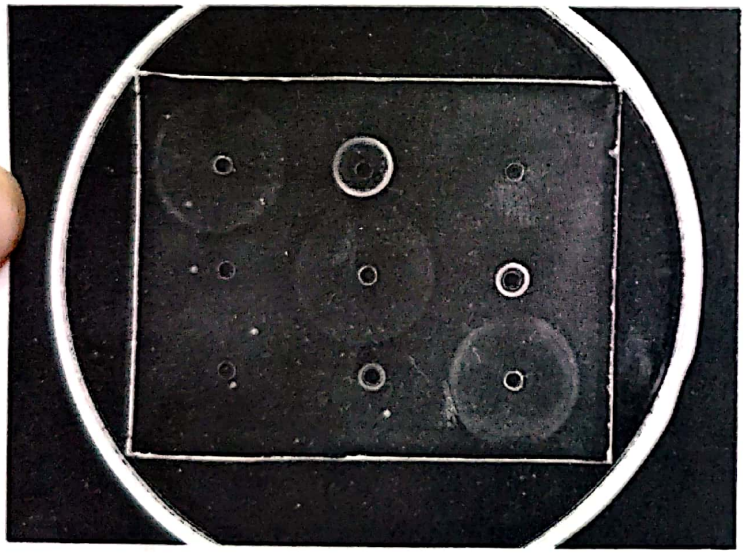
XII — Foto 3 — Testul de rozetare EAC (limfocite de tip B bovine) (P ă u n e s c u și col.)



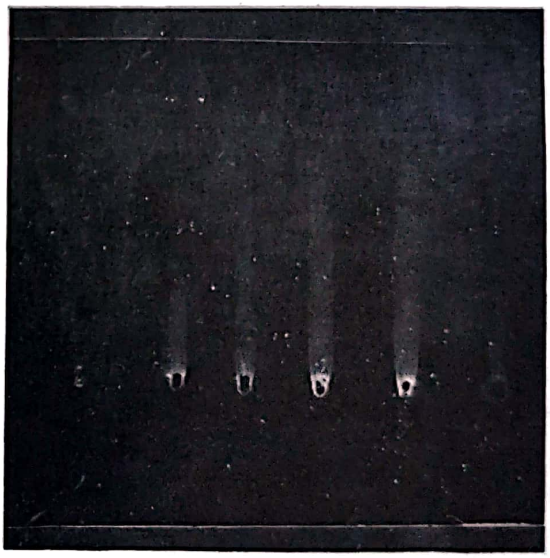


XII — Foto 5 — Testul de imunodifuziune dublă în gel de agar; model aplicat pentru identificarea corelațiilor antigenice (P ă l t i n e a n u și col.)

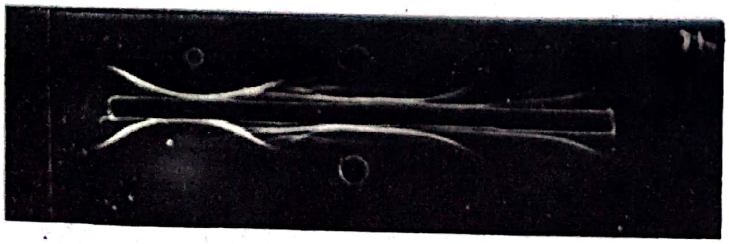
XII — Foto 6 — Testul de dublă difuziune în gel de agar — model pentru titrarea concentrației anticorpilor anti-albumină de bou



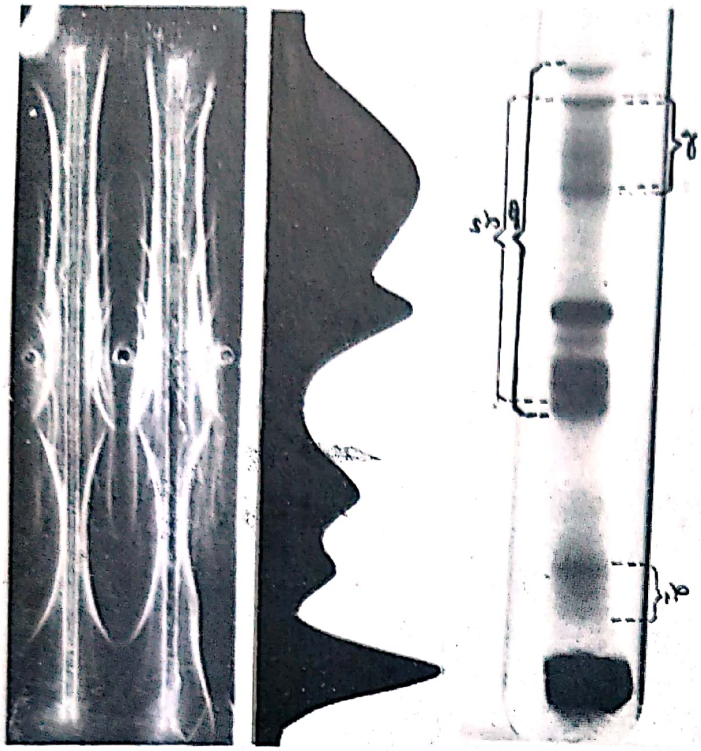
XII — Foto 8 — Testul de imunodifuziune radială aplicat cu seruri diverse de bovine, avînd concentrații diferite de IgG



XII — Foto 7 — Metoda rachetei aplicată cu IgG de bou incorporat în gel și ser anti-IgG

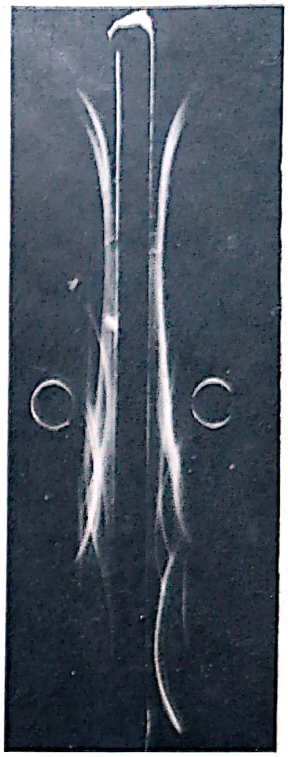


XII — Foto 9 — Imunoelectroforeza serului normal de cal



XII — Foto 10 — Electroforeza în gel de poliacrilamidă, în gel de agar și imunoelectroforeza serului normal de porc (Ț e ț u)

←



→

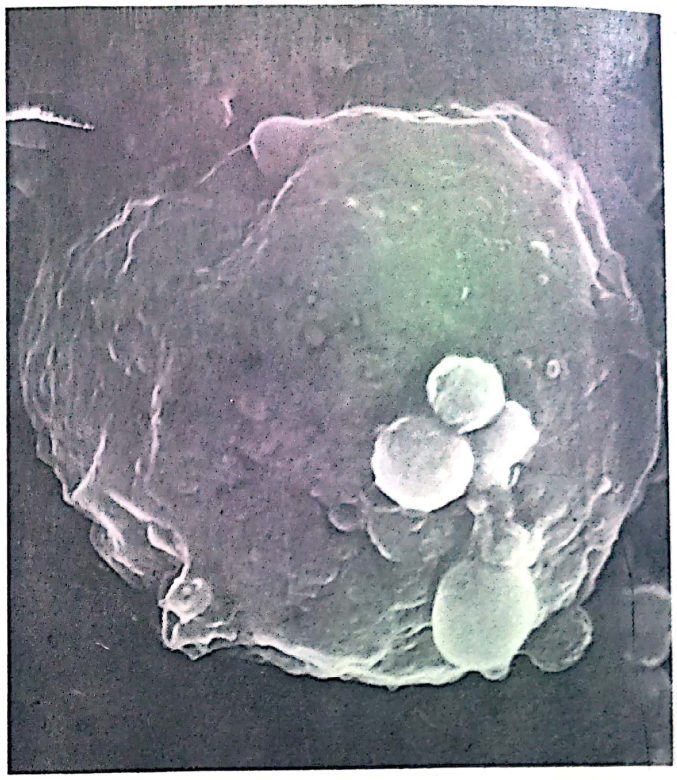
XII — Foto 11 — Testul de imunoelectroforeză cu seruri de bovine (Concentrații scăzute de albumină. Se observă fracțiunile IgG_1 și IgG_2)

XII — Foto 12 — Testul de imunofluorescență directă aplicat în diagnosticul encefalomielitei infecțioase aviare; evidențierea virusului în ficat (R a d u și col.).

XII — Foto 13 — Testul de imunofluorescență directă aplicat în diagnosticul bursitei infecțioase aviare (virus pe culturi celulare) (R a d u și col.).

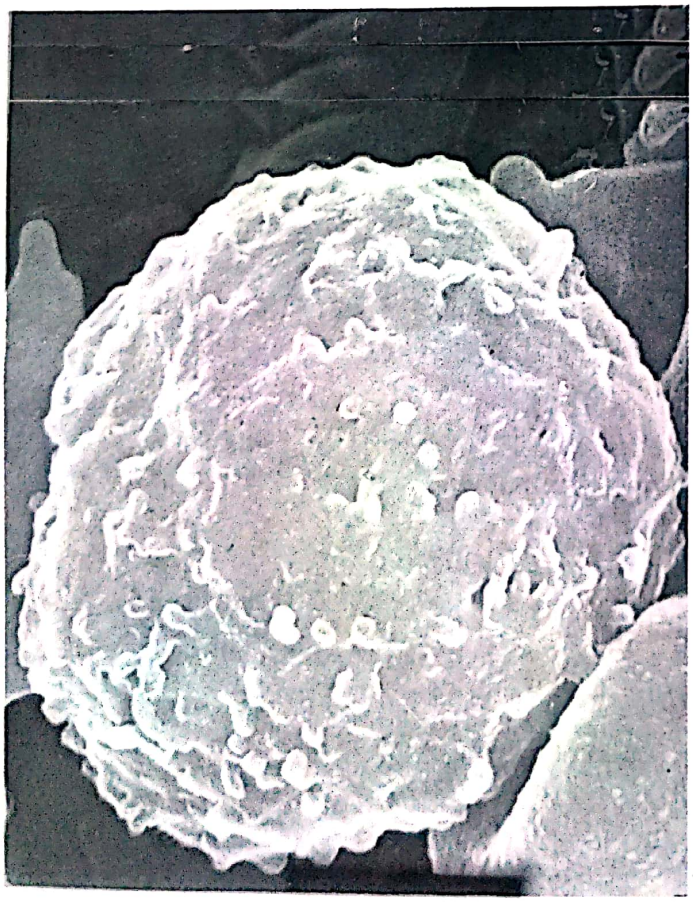
Scanned with OKEN Scanner

XII — Foto 14 — Testul de imunofluorescenţă directă; plaje de celule cu virusul pestei procine pe linia celulară PK_{15} (P ă l t i n e a n u şi col.).

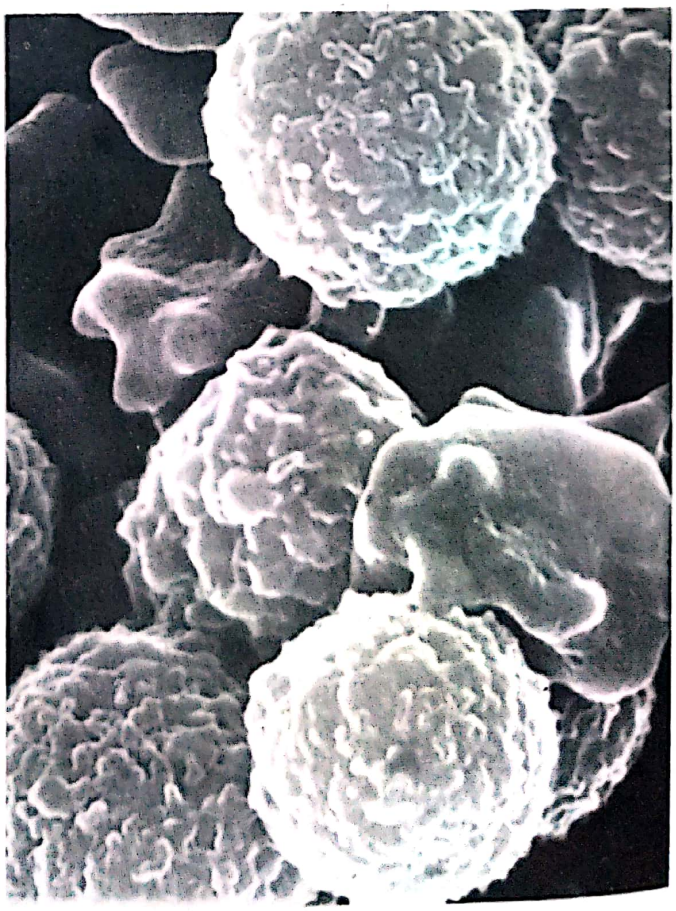


XII — Foto 15 — Celulă paralimfoblastică (× 25 000)

XII — Foto 16 — Celulă limfoblastică „B" leucemică (×30 000)



XII — Foto 17 — Grup de celule leucemice limfocitare „B" de bovine (×6 000)



Scanned with OKEN Scanner

Se amestecă cu acid tanic 0,0005% şi se incubează 10 minute la 37°C. Suspensia se centrifughează şi celulele se spală într-un volum de tampon fosfat salin şi se suspendă în 5 volume tampon fosfat.

Pentru ataşarea antigenului se amestecă suspensia de globule roşii cu antigenul în concentraţie dinainte stabilită. Amestecul se lasă la temperatura camerei timp de 30 minute, apoi se centrifughează. Depozitul de globule roşii se spală cu ser normal de iepure. Celulele astfel preparate sînt stabile la 4°C.

Cuplarea (ataşarea) chimică a antigenelor pe suprafaţa globulelor roşii. În cazul acestei metode se pot utiliza diferite substanţe cum este benzidina bidiazotată. Se preferă în acest caz globule roşii formolate. Se prepară în prealabil un compus al benzidinei (BDB) care se stochează la —20°C. Pentru cuplarea antigenului pe globule roşii, se incubează la temperatura camerei globulele roşii, antigenul în amestec cu soluţia BDB. Apoi se spală celulele sensibilizate cu clorură de chrom, difluorobenzen.

Aglutinarea globulelor roşii de către serul specific antigenului adsorbant se efectuează fie în tuburi, fie pe lamă sau în plăci de material plastic, după metodele utilizate în aglutinarea directă.

În scopul măririi sensibilităţii testului de hemaglutinare pasivă şi obţinerii unor titruri superioare, Marx şi col. (1979) tratează eritrocitele diferitelor specii cu pronază, reuşind în acest mod să îndepărteze parţial sialoglicoproteinele de pe membrana eritrocitelor; în acest fel, este favorizată cuplarea antigen-anticorp. În cazul hematiilor bovine hemaglutinarea se produce numai în cazul aplicării tratamentului enzimatic.

Interpretarea reacţiei se face ca şi în cazul reacţiilor de aglutinare obişnuite, în funcţie de aspectul şi mărimea depozitului de globule roşii. În cazul reacţiei pozitive, depozitul este granular, neomogenizabil.

Aplicaţii. Reacţia este aplicabilă cu bune rezultate în studiul reacţiilor antigenice între bacteriile Gram negative, folosindu-se drept antigene extracte cum este cazul celor care conţin complexul lipopolizaharidic. Deosebit de sensibil s-a dovedit testul de hemaglutinare pasivă pentru identificarea serotipurilor de *Pasteurella multocida* pe baza antigenului capsular fixabil direct pe suprafaţa globulelor roşii. Iordache şi Ungureanu (1976) aplică testul de HA indirectă cu antigene capsulare şi seruri anticapsulare pentru identificarea tulpinilor de *P. haemolytica* şi *P. multocida*. În diagnosticul pleuropneumoniei contagioase a bovinelor, reacţia se aplică cu hematii pe suprafaţa cărora s-a adsorbit toxina extrasă din *Mycoplasma mycoides*.

În diagnosticul tuberculozei, fără a avea un grad deosebit de specificitate, poate fi utilizată, cu rezultate mulţumitoare, fiind cunoscută sub numele de reacţia Middlebrook-Dubos (1948).

Sfera de aplicare a hemaglutinării pasive nu este limitată. În funcţie de nevoi, ea poate fi adaptată pentru evidenţierea anticorpilor care produc agregarea antigenului fiind mai sensibilă, comparativ cu celelalte reacţii bazate pe evidenţierea agregatelor antigen-anticorp.

XII. 3.6. Testul de imunohemoliză pasivă (TIHP)

Principiul metodei. Ca şi în cazul testului de hemaglutinare pasivă, antigenul este fixat la eritrocite şi reacţionează apoi cu anticorpii specifici, formîndu-se în acest fel complexe antigen-anticorp. Realizarea

Scanned with OKEN Scanner

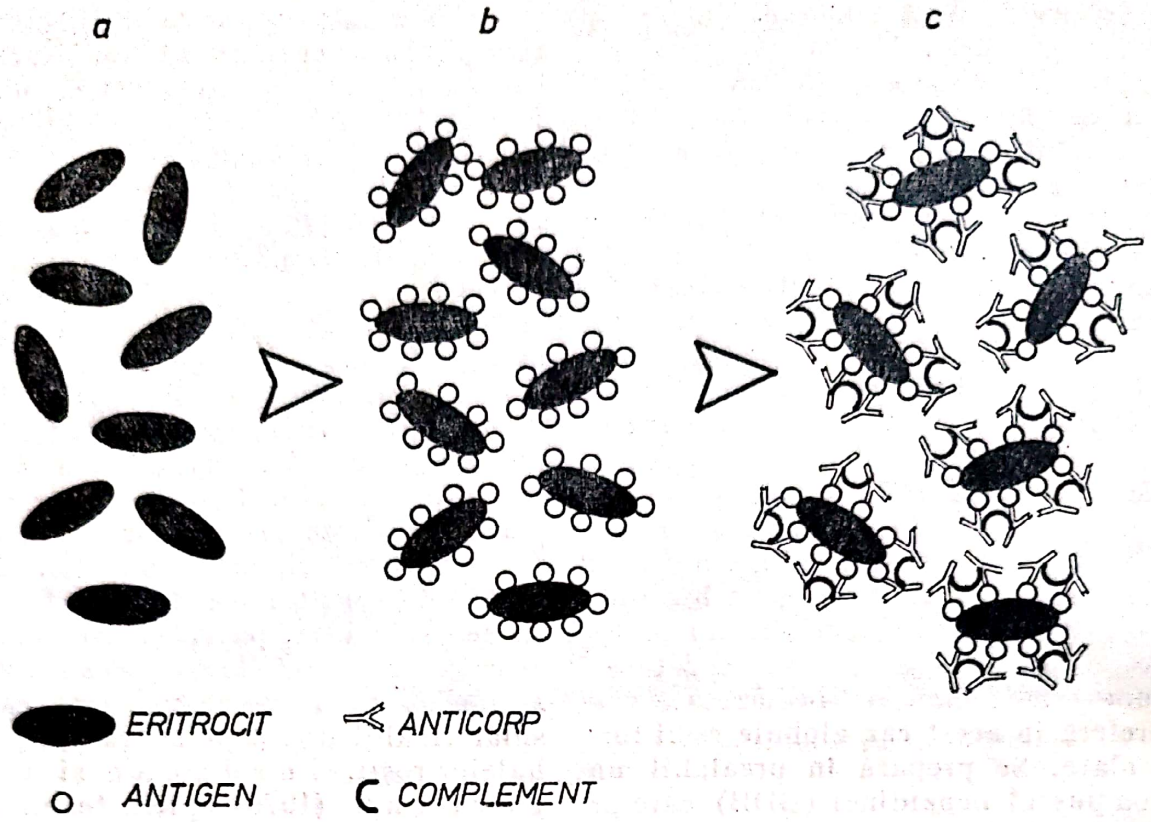


Fig. 46 — Reprezentarea schematică a testului de imunohemoliză pasivă
a — eritrocite; *b* — cuplarea antigenului la eritrocite; *c* — liza eritrocitelor sensibilizate în urma adăugirii anticorpilor şi a complementului

acestui complex, în prezenţa complementului, determină liza globulelor roşii sensibilizate cu antigen (fig. 46).

Spre deosebire de testul de hemaglutinare pasivă, sînt folosite numai globule roşii netratate în prealabil în vederea stabilizării (astfel de tratamente duc la crearea rezistenţei globulelor roşii la acţiunea litică a complementului); dată fiind această situaţie sînt folosite, dacă este necesar, numai substanţe mediatoare ale cuplării care nu determină stabilizarea hematiilor.

Sensibilitatea acestui test este similară celei a testului de hemaglutinare pasivă; în acelaşi timp, interpretarea sa este mai uşoară.

Materiale necesare: eritrocite (de cele mai multe ori sînt folosite cele de oaie dar rezultate bune au fost obţinute şi cu eritrocitele de găină);

— substanţele cu ajutorul cărora se realizează cuplarea (glutaraldehida clorură de crom, benzidina diazotată sau carbodiimida);

— antigenul, reprezentat de suspensia de virus;

— serul martor pozitiv, inactivat şi absorbit cu eritrocite; serul martor negativ, inactivat şi absorbit cu eritrocite;

— serurile de cercetat.

Efectuarea testului. Cuplarea antigenului viral la eritrocite se realizează prin contactul dintre suspensia de eritrocite şi cea de virus, diluarea amestecului făcîndu-se în soluţia de clorură de crom (în cazul folosirii acestei substanţe). După un contact cu durată variabilă, în funcţie de sistemul cercetat, amestecul se centrifughează, eritrocitele depuse se spală de mai multe ori şi apoi se suspendă soluţia fiziologică tamponată.

În tuburi de reacţie se repartizează serurile de testat, precum şi serurile martor, în diluţii seriate şi eritroci-

tele sensibilizate. Se incubează la temperaturi şi perioade variabile. Se adaugă complementul şi se omogenizează amestecul. După o nouă perioadă de incubaţie se apreciază gradul de hemoliză, rezultatele fiind superioare prin centrifugarea tuburilor de reacţie.

Testul de inhibare a hemolizei imune pasive este analog în bună măsură testului de inhibare a hemaglutinării, deosebirea esenţială constînd în desfăşurarea reacţiei în prezenţa complementului.

În cazul în care în prima etapă a reacţiei se formează complexul antigen-anticorp, nu mai rămîn disponibili anticorpi care să reacţioneze cu hematiile sensibilizate, astfel încît în ultima etapă complementul nu este cuplat cu eritrocitele sensibilizate şi acestea nu sînt lizate. În acest caz, rezultatul testului este considerat pozitiv. În situaţia în care nu se formează complexul antigen-anticorp, în ultima parte anticorpii liberi reacţionează cu eritrocitele sensibilizate şi are loc liza acestora; rezultatul testului este considerat negativ.

În testul de imunohemoliză pasivă, interpretarea rezultatelor se face în funcţie de gradul hemolizei obţinute, luîndu-se în consideraţie: dimensiunile sedimentului de eritrocite nehemolizate şi intensitatea culorii supernatantului.

Aplicaţii. Testul de imunohemoliză pasivă a fost aplicat în scopul tipizării şi subtipizării tulpinilor de virus aftos. De asemenea, metoda a fost utilizată în lucrările de identificare a altor virusuri patogene pentru animale. TIHP este util în determinările cantitative ale anticorpilor iar testul de inhibare a THIP poate fi folosit pentru evidenţierea unor antigene.

XII. 3.7. Testul de inhibare a sinciţiilor

Este cunoscut faptul că unele virusuri au proprietatea de a forma sinciţii în culturile celulare pe care le infectează. Astfel, virusul leucozei enzootice bovine induce sinciţii pe culturi de celule diploide de pulmon embrionar uman, pe linia Vero de maimuţă etc.

În cazul cultivării virusului în prezenţa serurilor pozitive specifice, dezvoltarea sinciţiilor este inhibată; această proprietate nu o au serurile bovine negative. Aceste constatări au permis elaborarea unui test rapid şi simplu de decelare a anticorpilor contra virusului leucozei enzootice bovine (LEB).

Testul se efectuează prin co-cultivarea virusului LEB în culturi celulare (de exemplu pe linia FLK) cu o linie celulară care are proprietatea de a forma sinciţii. După formarea monostratului de cultură se adaugă, în tuburi diferite, serurile de testat, inclusiv seruri martor negative şi pozitive cunoscute. Se păstrează, de asemenea, plăci cu culturi în care urmează să se dezvolte sinciţii (foto XII. 36).

În cazul constatării inhibiţiei formării sinciţiilor, se consideră că serul conţine anticorpi contra virusului respectiv.

XII. 3.8. Inhibarea dezvoltării în culturi prin anticorpi

Inhibarea dezvoltării în culturi prin anticorpi specifici, descrisă pentru prima dată de Edward şi Fitzgerald, 1954 (cit. Drăghici şi Ungureanu, 1972) este o reacţie serologică specifică pentru micoplasme şi poate fi aplicată ca o metodă de identificare la acest grup de mico-

Scanned with OKEN Scanner

organisme. În tehnica folosită inițial, germenii erau cultivați pe medii în care era înglobat serul specific. Ulterior, C l y d e (1964) modifică metoda, utilizînd discurile de hîrtie de filtru îmbibate cu ser imun.

Materialele necesare. Plăci cu agar PPLO.

Culturi de micoplasme în medii lichide în faza logaritmică de creștere.

Seruri hiperimune specifice preparate pe iepuri.

Discuri de hîrtie de filtru sterile cu diametrul de 6 mm (pentru varianta discurilor).

Tehnicile de executare. A. Metoda cultivării în plăci cu ser înglobat în mediu. Se incorporează în agar PPLO ser specific hiperimun în proporție de 5%. În paralel, se pregătesc și plăci martor, cu 5% ser de iepure normal. Se însămînțează cîte 0,1 ml din fiecare cultură pe suprafața a două plăci (una cu ser hiperimun și alta cu ser normal). Plăcile se incubează în atmosferă umedă. Această metodă dă rezultate bune, dar necesită cantități mari de ser hiperimun.

B. Metoda discurilor. După repartizarea mediului, plăcile cu agar PPLO se usucă și apoi se însămînțează cu cultură care se răspîndește uniform pe suprafața mediului. După uscare se depun pe suprafața gelozei însămînțate rondele de hîrtie de filtru îmbibate cu ser imun, pregătite astfel: fiecare disc se îmbibă cu ser antimicoplasmic depus cu micropipeta sau ansa calibrată. O variantă mai simplă de îmbibare a discurilor constă în introducerea acestora într-o placă Petri și depunerea de ser cu o pipetă Pasteur, după care se îndepărtează excesul prin trecerea rondelelor în altă placă Petri uscată. Discurile astfel pregătite se depun pe suprafața mediului însămînțat. Paralel, se depun și discuri martor îmbibate cu ser normal de iepure.

Placa se incubează la 37°C timp de 48 ore și se examinează zilnic cu lupa.

D r ă g h i c i și col. (1972) folosesc cu bune rezultate o altă variantă tehnică. În locul metodei rondelelor, aplică metoda cupelor în agar. În stratul de agar se excavează cupe cu diametrul de 6 mm. Cultura de micoplasme se însămînțează abundent pe suprafața gelozei cu godeuri, se îndepărtează excesul de lichid, se usucă și apoi se depun în fiecare godeu cîte 2—3 picături de ser imun pînă la umplerea godeului (var. C).

Interpretarea reacției. În cazul folosirii metodei de însămînțare pe plăci cu ser imun înglobat în mediu (varianta A) creșterea este inhibată în plăcile cu ser imun, în timp ce în plăcile martor cultura este bine dezvoltată.

În cazul variantelor B și C, după 48—72 ore de incubare la 37°C, se examinează sub lupă mărimea zonei de inhibare din jurul discurilor sau al godeurilor.

În aplicarea acestui test în cazul micoplasmelor, trebuie să se ia în considerare o serie de factori care pot influența rezultatele, cum sînt: modul și durata de conservare a serului, vîrsta culturii și cantitatea de germeni însămînțați (D r ă g h i c i și U n g u r e a n u , 1972). Serul își conservă proprietățile inhibante timp de 60 zile la temperatura de 4°C și peste un an la —20°C, fără să fie influențat de congelări și decongelări. Dacă activitatea inhibantă a unui ser scade cu timpul, ea poate fi restaurată prin adăugarea de ser normal proaspăt de iepure. Efectul de potențare a serului normal determină creșterea efectului inhibitor de aproximativ 100 de ori. Mărimea zonei de inhibiție variază și în funcție de vîrsta culturii; în plăci însămînțate cu culturi de 24 ore, zonele de inhibare sînt cu 25% mai mici decît cele însămînțate cu culturi de 4—8 ore.

Diferitele clase de imunoglobuline nu au un efect inhibitor egal. Astfel, IgG inhibă creșterea micoplasmei omoloage în concentrație de 0,06 și 0,13 mg/ml proteină, iar serul total în concentrație de 0,22 mg/ml.

Scanned with OKEN Scanner

Aplicații. Testul de inhibare a dezvoltării în culturi se aplică îndeosebi în identificarea speciilor de micoplasme, cît și pentru punerea în evidență a anticorpilor din serul animalelor din focarele de boală. Comparativ cu celelalte reacții serologice folosite în studiul micoplasmelor (reacția de aglutinare, inhibarea hemaglutinării, inhibarea hemadsorbției, RFC), inhibarea creșterii se consideră a fi mai specifică.

XII. 3.9. Testul COFAL (Complement fixation in avian leucosis)

Testul COFAL se bazează pe constatarea făcută de Sarma și col. (1964) că serul de hamster, purtător de fibrosarcom primar sau transplantat indus de tulpina Schmidt-Ruppin (R—S) al virusului sarcomului Rous conține anticorpi fixatori de complement (CF) care reacționează nu numai cu virusul homolog, dar și cu antigenele provenite de la alte virusuri ale leucozelor aviare.

Principiul. Prin testul COFAL se detectează antigenele de grup specifice, prezente în celulele infectate cu virusurile aviare de tip leucoză/sarcom, folosindu-se serul de hamster anti-Schmidt-Ruppin (o tulpină de virus al sarcomului Rous) în microreacție de fixare a complementului.

Materiale — Ser de hamster anti Schmidt-Ruppin (activ față de tulpina cu același nume a virusului sarcomului Rous).

— Virusul de cercetat propagat pe culturi celulare.

— Celule embrionare de pasăre, susceptibile genetic față de virusurile sarcomului Rous din subgrupele A și D. Cele mai adecvate sînt culturile primare sau secundare de fibroblaste de pasăre (10 zile), provenite din efective libere de leucoză.

— Plăci cu diametrul de 6—10 mm și medii pentru culturi celulare.

— Elementele necesare reacției de fixare a complementului și anume:

— probe martor — antigen pozitiv standard;

— ser pozitiv;

— ser normal de hamster;

— alexină de cobai;

— sistemul hemolitic: hematii de oaie și ser hemolitic anti-oaie;

— plăci pentru microreacție.

Tehnica de lucru. Reacția se execută în două etape:

I. Propagarea virusului de detectat pe culturi celulare de fibroblaste embrionare de pasăre.

— II. Detectarea prin microtehnica de fixare a complementului, a prezenței antigenului de grup din culturile celulare, în care a fost propagat virusul de testat.

Etapa I — propagarea antigenului:

— în plăci de 60—100 mm diametru cu culturi celulare, se inoculează materialul de testat și se lasă să se adsoarbă timp de 24 ore la 37°C sau 1/4—4 ore dacă se presupune că materialul este toxic pentru culturi celulare;

— la fiecare set se introduc și martori:

— cultura inoculată cu virus al leucozei subgrupa A;

— cultura inoculată cu virus al leucozei aviare subgrupa B;

— negativi: plăci neinoculate;

După 18—24 ore se îndepărtează inoculumul și se adaugă mediu proaspăt. Se lasă astfel culturile la incubat timp de 4—5 zile. La fiecare 3 zile se fac subculturi pentru a menține o creștere activă timp de 14 zile. Celulele reținute după fiecare pasaj și

Scanned with OKEN Scanner

acelea recoltate la sfîrşit, se spală şi se suspendă în tampon veronal astfel ca să se obţină o concentraţie de 10^7 celule/ml.

Pentru eliberarea virusului în cazul cînd acesta este prezent în celule, suspensia se supune la 3 cicluri de congelare şi decongelare succesive sau ultrasonării. Materialul obţinut se conservă la —70°C pînă la efectuarea testului.

Etapa II —reacţia de fixare a complementului.

Materialul de testat, obţinut pe culturi celulare după tehnica descrisă mai sus, reprezintă antigenul în reacţia de fixare a complementului; din el se execută diluţii 1:2, 1:4 şi 1:8, după o prealabilă testare pentru anticomplementaritate în diluţia 1:2. În godeurile plăcii se repartizează pentru microreacţie diluţiile de antigen, se adaugă (în volum egal cu al antigenului), antiser de hamster activ faţă de tulpina Schmidt-Ruppin de virus al sarcomului Rous şi 5 unităţi hemolitice de complement de cobai.

Plăcile se incubează la 4°C timp de 15—18 ore.

Se adaugă apoi un volum din suspensia 1,4% de hematii de oaie în tampon sensibilizat cu ser anti-oaie.

Se incubează 30 minute la 37°C.

Citirea reacţiei se face după centrifugare sau după menţinere timp de 1—6 ore la 4°C.

Interpretarea reacţiei. Se consideră reacţia de fixare a complementului pozitivă cînd hemoliza este sub 30%.

Prezenţa virusului în materialul testat este indicată prin reacţia de fixare a complementului pozitivă la diluţii de antigen 1:4 sau mai mari în condiţiile absenţei anticomplementarităţii şi a martorilor uzuali.

Aplicaţii. Testul COFAL se foloseşte pentru detectarea şi identificarea virusurilor leucozelor aviare din toate subgrupele şi pentru controlul vaccinurilor vii preparate pe culturi celulare de pasăre.

XII. 3.10. Testul de imunofluorescenţă

Metodă elaborată relativ recent, testul de imunofluorescenţă ocupă în prezent un loc important în diagnosticul unor boli infectocontagioase, identificarea şi tipizarea germenilor bacterieni, virali şi parazitari, cercetările cu privire la biosinteza anticorpilor, identificarea celulelor imunocompetente etc.

Principiul metodei se bazează pe conjugarea chimică a anticorpilor cu anumite substanţe care au proprietatea de a fi fluorescente în cazul iradierii în lumină ultravioletă. O substanţă fluorescentă se caracterizează prin capacitatea de absorbţie a energiei luminoase într-o lungime de undă diferită de cea pe care o emite. Ca urmare, formarea complexului antigen-anticorp (cu o imunoglobulină-anticorp marcată) va fi evidenţiată printr-o fluorescenţă de culoare diferită, în funcţie de substanţa fluorescentă folosită.

Variante ale metodei. Metoda directă este utilizată în scopul decelării antigenelor (bacterii, virusuri etc.) cu ajutorul anticorpilor (imunoglobuline totale, o clasă de imunoglobuline sau anumite fragmente ale moleculelor de imunoglobuline) marcaţi cu o substanţă fluorescentă (fig. 47) .

Metoda indirectă constă în formarea complexului antigen-anticorp şi evidenţierea sa într-o etapă ulterioară prin cuplarea cu un ser contra imunoglobulinelor speciei de animal la care se efectuează testarea; acest antiser este conjugat cu o substanţă fluorescentă şi, ca urmare, cuplarea sa va indica prezenţa anticorpilor faţă de antigenul cunoscut introdus în reacţie. Rezultă că în această variantă anti-

Scanned with OKEN Scanner

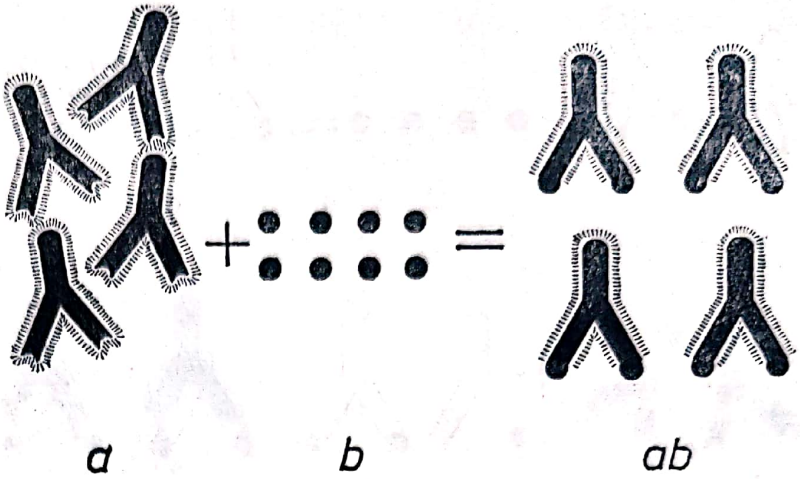


Fig. 47 — Reprezentarea schematică a metodei de imunofluorescenţă
a — anticorpi marcaţi; b — antigen; ab — complex antigen — anticorp fluorescent

corpul nemarcat (de fapt serul de testat) are un rol dublu, acţionînd ca anticorp în prima parte a reacţiei şi ca antigen în a doua parte. În acest fel, un singur antiser marcat contra globulinelor unei specii de animal poate fi folosit la mai multe tehnici de testare, pentru evidenţierea prezenţei anticorpilor faţă de un număr practic nelimitat de antigen (desigur, cu condiţia introducerii în reacţie a antigenului respectiv) (foto XII. 12, 13, 14).

Metoda complementului se bazează pe constatarea după care adăugarea la reacţie a unui ser heterolog proaspăt are un efect de potenţare a intensităţii colorării fluorescente. Pentru realizarea procedeului, după ce antiserul specific reacţionează cu antigenul, se adaugă complement de cobai, urmat de introducerea în reacţie a unei globuline anti-cobai marcată cu o substanţă fluorescentă. Imaginea fluorescentă este constatată numai dacă alexina s-a cuplat cu complexul antigen-anticorp realizat în prima etapă.

Wang şi Graystone (1974), Wang şi col. (1975, 1977) au descris un test de microimunofluorescenţă care a fost utilizat pentru imunoclasificarea germenilor din speciile *Chlamydia* şi *Neisseria*.

Materialele necesare pentru efectuarea diverselor variante ale metodei sînt:

— antigenele, reprezentate de culturi bacteriene, virusuri pe cultur_ celulare, organe în care sînt prezente antigenele etc;.

— serurile care urmează să fie testate;

— ser (imunoglobuline, IgG) marcat contra imunoglobulinelor speciei de animal la care se cercetează eventuala prezenţă a anticorpilor (pentru aplicare prin metoda indirectă);

— complement şi ser anticomplement marcat (pentru aplicare prin metoda complementului);

— lame speciale;

— microscop special, cu posibilităţi de citire a reacţiilor în lumină ultravioletă.

În vederea efectuării oricăreia dintre cele trei variante, sînt necesare o serie de testări prealabile pentru stabilirea concentraţiilor optime ale elementelor de reacţie, a timpilor de lucru în diverse etape, a temperaturii optime şi a altor condiţii. În cazul testului de imunofluorescenţă, în mod special, nu sînt aplicabile tehnici invariabile, indiferent de sistemul testat.

Efectuarea testului. În *metoda directă*, pe lamele cu antigenul fixat se repartizează serul (globulina) marcat şi se incubează la temperaturi variabile şi timpi diferiţi. După cîteva spălări cu soluţie-tampon adecvate şi uscate, lamele se examinează în lumină ultra-

Scanned with OKEN Scanner

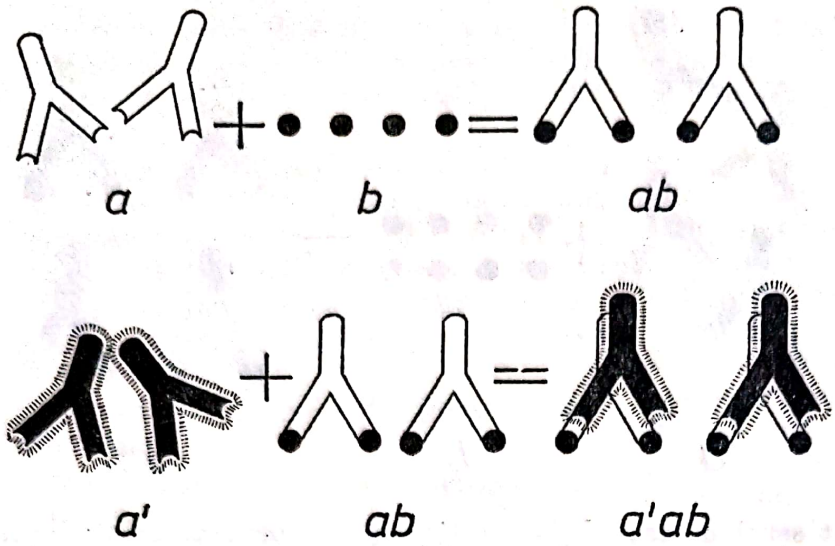


Fig. 48 — Reprezentarea schematică a testului de imunofluorescenţă indirectă

a — anticorpi nemarcaţi; *b* — antigen; *ab* — complex antigen-anticorp; *a'* — anti-anticorpi marcaţi; *a'ab* — complex (antigen-anticorpi-anti-anticorpi) marcat

violetă la un microscop pentru fluorescenţă. Este obligatorie folosirea unor teste martor: reacţii pozitive obţinute cu antigen cunoscut; preparate de culturi celulare neinfectate cu virusul a cărui prezenţă este cercetată. Pot fi de asemenea folosite teste de inhibare a reacţiei prin ser imun specific neconjugat cu care se tratează antigenul fixat pe lamă, înainte de repartizarea serului specific conjugat. Competiţia care ia naştere va determina diminuarea semnificativă a intensităţii fluorescenţei. Dimpotrivă, pretratarea antigenului cu ser nespecific nu va influenţa desfăşurarea şi rezultatele reacţiei.

În *metoda indirectă*, proba de antigen cunoscut fixată pe lamă este tratată cu serul de cercetat (în care se presupune că sînt prezente imunoglobinele specifice) nemarcat. După o perioadă de incubaţie cu o durată adecvată, în cazul prezenţei anticorpilor faţă de antigenul cunoscut, se realizează complexul imun: după îndepărtarea excesului de anticorpi, proba se tratează cu imunoglobulina antiser de specie marcată; are loc formarea celui de al doilea complex antigen-anticorp care va fi decelat prin examinare în lumină ultravioletă (fig. 48, 49).

La efectuarea testării vor fi folosiţi martori de reacţie: antigen şi ser-mar-

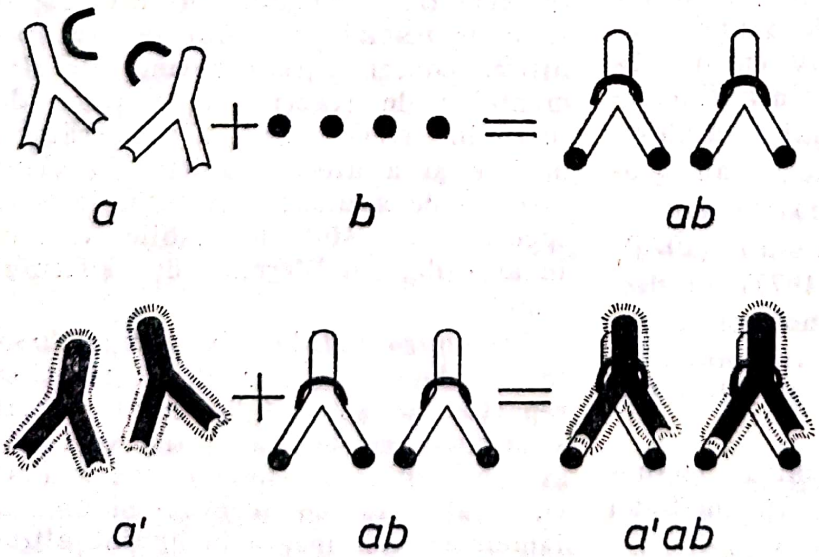


Fig. 49 — Reprezentarea schematică a metodei complementului

a — anticorp nemarcat şi complement; *b* — antigen; *ab* — complex antigen-anticorpi — complement; *a'* — anticomplement marcat; *a'ab* — complex imunofluorescent

tor pozitiv cunoscut, antigen şi ser martor negativ cunoscut, serul martor pozitiv în absenţa antigenului cunoscut (de exemplu, în cazul unor virusuri, cultura de celule neinfectată).

Interpretarea reacţiilor se bazează pe observarea şi notarea prezenţei colorării fluorescente a complexelor imune formate în cazul reacţiilor pozitive. Citirea rezultatelor este o operaţie care solicită o pregătire specială, avînd în vedere necesitatea de a se ţine seama de o serie de factori ca intensitatea fluorescenţei în comparaţie cu probele martor, localizarea colorării, prezenţa unor elemente care au o fluorescenţă nespecifică, aspectul zonelor fluorescente etc.

Aplicaţii. Testele de imunofluorescenţă sînt în prezent folosite în mod special pentru evidenţierea antigenelor sau a anticorpilor specifici, în scopul stabilirii diagnosticului unor boli bacteriene sau virale.

Astfel, diagnosticul turbării, bolii lui Carré, leucozei enzootice bovine, pestei porcine africane este stabilit şi prin testele de imunofluorescenţă. Mai puţin răspîndită în practică este aplicarea acestor metode în decelarea infecţiilor cu virusurile influenţei, pseudopestei aviare, parainfluenţei, bolii limbii albastre, febrei aftoase etc.

În cazul a numeroase boli bacteriene folosirea testului de imunofluorescenţă s-a dovedit utilă, cu toate că alte teste (bacteriologice, serologice etc.) pot contribui la elucidarea etiologiei unor îmbolnăviri: infecţiile produse de clostridii, bacilul cărbunos, micobacterii, enterobacteriacee, brucele etc. Este de remarcat că utilizarea acestor metode în cazul bolilor bacteriene şi parazitare este, fără îndoială, mai puţin extinsă decît în cazul bolilor cu etiologie virală.

Radu şi col. (1978) au aplicat testul IF în diagnosticul encefalomielitei infecţioase aviare.

Dănescu şi col. (1978) constată că germenii anaerobi patogeni din genul *Clostridium* pot fi evidenţiaţi prin metoda IF directă.

În cazul alegerii metodelor de imunofluorescenţă, este necesar să se ţină seama atît de avantajele cît şi de dezavantajele pe care le prezintă.

Aceste teste se impun în primul rînd prin posibilitatea pe care o oferă de a obţine un rezultat foarte rapid, comparabil din acest punct de vedere numai cu testul de imunoelectroprecipitare. Pentru laboratoarele care nu au posibilitatea efectuării examenelor virusologice şi serologice complexe, diagnosticul unor boli virale prin imunofluorescenţă reprezintă o alternativă aplicabilă cu relativă uşurinţă, cu condiţia primirii reactanţilor necesari şi a dotării cu un microscop adecvat. Aceste teste sînt deosebit de sensibile şi în acelaşi timp specifice.

Testele de imunofluorescenţă prezintă şi unele dezavantaje. Astfel, prin ele sînt decelaţi şi agenţi virali sau bacterieni inactivaţi. De asemenea, este necesar să se ţină seama că interpretarea rezultatelor la oricare dintre variante este destul de complexă, fapt care impune o specializare corespunzătoarea personalului.

Toate aceste dezavantaje pot fi însă depăşite; extinderea aplicării testului de imunofluorescenţă, alături de alte teste serologice, va contribui la lărgirea posibilităţilor de diagnostic în numeroase boli.

XII. 3.11. Testul imunoenzimatic

Elaborat relativ recent (Engvall şi Perlmann, 1971—1972), testul imunoenzimatic (TIE) reprezintă o realizare de o importanţă deosebită, aplicabilă atît în cercetările referitoare la răspunsul imun faţă de diverse

Scanned with OKEN Scanner

antigene cît şi în diagnosticul de laborator al unor afecţiuni produse de diferiţi factori etiologici.

Principiul metodei. Antigenul sau anticorpii fixaţi printr-un proces de absorbţie fizică nespecifică la un suport solid, se cuplează cu anticorpii sau antigenul din soluţia de testat; realizarea complexului antigen-anticorp este evidenţiată cu ajutorul antiimunoglobulinei marcate cu o enzimă, în funcţie de intensitatea degradării substratului specific enzimei respective.

Metoda se caracterizează printr-o mare sensibilitate (permite decelarea anticorpilor în cantităţi de ordinul nanogramelor), apropiată de cea a testului radio-imunologic, prin stabilitatea ridicată a elementelor de reacţie şi prin echipamentul de laborator necesar relativ simplu; testul imunoenzimatic este aplicat în tot mai mare măsură pentru examinarea unui mare număr de probe, în diagnosticul unor boli bacteriene, virale sau parazitare.

Cercetări foarte recente (B u t l e r şi col., 1978) demonstrează că prin testul imunoenzimatic se evidenţiază în special gradul de afinitate a anticorpilor şi mai puţin concentraţia acestora.

Variante ale metodei. Evidenţierea anticorpilor faţă de un antigen cunoscut. Antigenul este adsorbit pe o suprafaţă solidă şi este incubat în prezenţa serurilor de cercetat. În cazul prezenţei anticorpilor specifici, aceştia se cuplează cu antigenul; formarea complexelor permite fixarea la suport a soluţiei antiglobulinice (ser anti-specie, de preferat imunoglobină anti-imunoglobulină) marcată cu o enzimă; peroxidază, fosfatază alcalină sau glucozoxidază. Cantitatea de conjugat cuplată, indicator al intensităţii reacţiei — deci al concentraţiei anticorpilor în serul testat — este determinată indirect prin cantitatea de substrat pe care o degradează enzima. Metoda permite, ca şi testul de imunofluorescenţă indirectă, decelarea unei mari varietăţi de anticorpi specifici, folosind un singur conjugat antiglobulinic.

Decelarea antigenelor. Metoda „competiţiei". Soluţia de imunoglobuline, cu activitate de anticorp faţă de antigenul a cărui decelare este urmărită, este adsorbită la suprafaţa suportului solid. Se adaugă o cantitate determinată de antigen cunoscut, marcat cu o enzimă, în amestec cu proba necunoscută care este examinată pentru a se stabili existenţa antigenului respectiv. Proporţia de antigen marcat fixat este determinată prin măsurarea hidrolizei substratului de către enzimă. Competiţia dintre antigenul marcat şi cel nemarcat, manifestată în procesul cuplării cu anticorpul specific, permite determinarea cantitativă a antigenului din proba necunoscută: cu cît concentraţia acestuia este mai mare, cu atît cantitatea de antigen marcat fixată este mai mică (fig. 50).

Metoda cu două soluţii de anticorpi. Pe suprafaţa solidă este adsorbită soluţia de anticorpi specifici faţă de antigenul a cărui determinare este urmărită. Se adaugă proba testată şi, în continuare, soluţia iniţială de anticorpi specifici, conjugaţi cu o enzimă. Cantitatea de enzimă cuplată la complexul antigen-anticorp format, indicînd prezenţa şi concentraţia antigenului, este apoi determinată în funcţie de degradarea substratului (fig. 51).

Metoda inhibiţiei. Se incubează proba de testat în prezenţa antiserului specific, care conţine anticorpi, la un nivel cunoscut, faţă de antigenul care urmează să fie decelat. Concentraţia anticorpilor rămaşi necuplaţi, indicator indirect al concentraţiei antigenului în soluţia testată, este determinată prin TIE (varianta în care antigenul corespondent este iniţial adsorbit pe suprafaţa purtătoare).

Testul imunoenzimatic amplificat (B u t l e r şi col., 1978) este o modificare a metodei standard în care se exclude folosirea anticorpilor antiglobulinici purificaţi specific, aceştia fiind

Scanned with OKEN Scanner

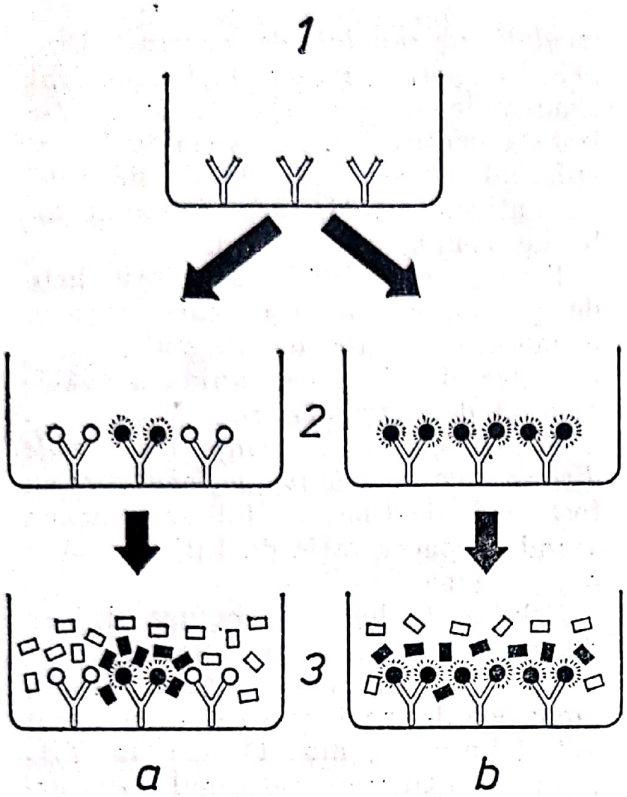


Fig. 50 — Testul imunoenzimatic (metoda competiţiei)

1 — adsorbţia anticorpilor; *2 a* — cuplarea cu antigenele: cunoscut-marcat; nemarcat; *3 a* — reacţia cu substratul; *2 b* — reacţia anticorpilor cu antigenul marcat; *3 b* — reacţia cu substratul

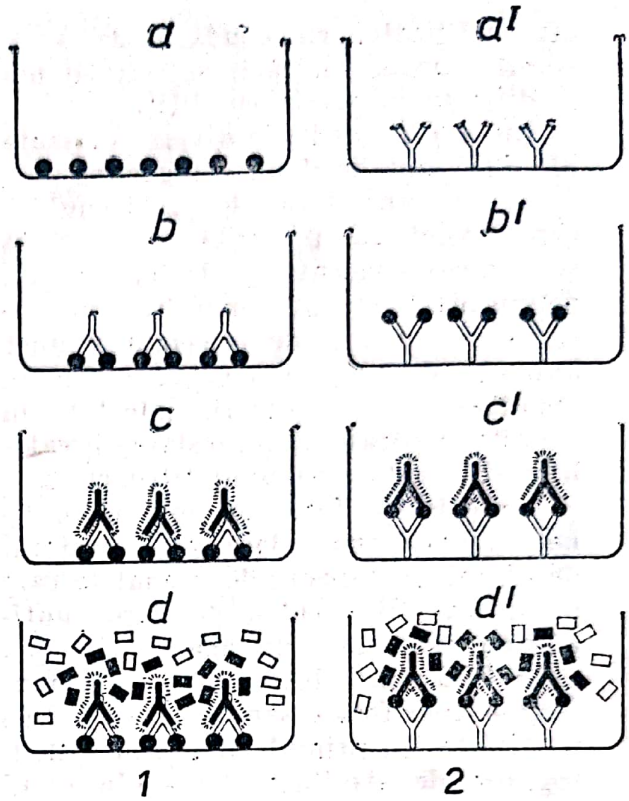


Fig. 51 Testul imunoenzimatic

1 — Metoda indirectă; *a* — adsorbţia antigenului; *b* — cuplarea antigenului cu anticorpii specifici; *c* — cuplarea cu antiglobulina marcată; *d* — reacţia cu substratul; *2* — metoda cu doi anticorpi; *a'* — adsorbţia anticorpilor; *b'* — cuplarea antigen-anticorp; *c'* — cuplarea cu antiglobulina marcată; *d'* — reacţia cu substratul

înlocuiţi cu aşa-numita „punte de anticorpi". La efectuarea metodei este necesar să se titreze antiserurile secundare, antiserurile-punte şi să se determine concentraţia optimă a complexului imun antifosfatază alcalină.

Materialele necesare. Antigenul folosit în reacţie este reprezentat de suspensia de bacterii, virusuri, componente solubile ale acestora sau ale unor paraziţi. Sînt utilizate, de obicei, extracte brute, avînd capacitatea de a se fixa pe suprafeţele solide prin adsorbţie fizică.

Antigenele folosite de diferiţi autori sînt reprezentate de: extracte de culturi tisulare sau de organe de la animale infectate experimental (antigene virale), extracte bacteriene lipopolizaharidice, suspensii de bacterii sau protozoare ultrasonate, lizate ale unor culturi de protozoare, extracte de larve de helminţi sau de helminţi adulţi, imunoglobuline etc.

Lichidul diluat folosit este o soluţie tampon avînd compoziţii diverse.

Alegerea concentraţiei optime de antigen se realizează prin testări „în tablă de şah" faţă de un ser pozitiv şi un ser negativ. Pentru efectuarea în continuare a lucrărilor este aleasă diluţia de antigen care asigură diferenţierea cea mai clară între serul pozitiv şi cel negativ. În cazul unor antigene purificate, obţinute prin metode fizice şi imunochimice, sînt posibile standardizarea şi definirea cantitativă a acestui element de reacţie. Caracterizarea antigenelor prin alte teste serologice, electroforeză în gel de poliacrilamidă, cromatografie, conţinut în proteină totală etc., este utilă pentru definirea şi standardizarea sa. Antigenele preparate pot fi păstrate congelate

Scanned with OKEN Scanner

sau liofilizate, cu condiţia de a se stabili durata păstrării activităţii nemodificate în aceste condiţii.

Anticorpii folosiţi în diverse variante ale TIE sînt de două categorii:

— anticorpi faţă de antigenul a cărui eventuală prezenţă este testată şi a cărui concentraţie trebuie să fie determinată; se obţin prin hiperimunizarea cu antigen de referinţă a unor animale din specii receptive sau se recoltează de la animale infectate în condiţii naturale, după testarea prealabilă şi constatarea unui titru ridicat;

— anticorpi faţă de imunoglobulinele (totale sau clase ale acestora, de obicei IgG) speciei de animal la care se aplică TIE pentru decelarea anticorpilor induşi de un agent etiologic.

În TIE sînt folosite în special imunoglobuline totale sau imunoglobuline purificate, în primul rînd prin cromatografie de afinitate. Ca şi în cazul antigenelor, este necesară stabilirea concentraţiei optime de anticorpi prin testare prealabilă „în tablă de şah".

Enzimele şi substratele folosite pînă în prezent sînt:

— *fosfataza alcalină* (obţinută din mucoasa de intestin de viţel), enzimă deosebit de activă, avînd ca substrat 4-nitrofenilfosfat, substanţă lipsită de toxicitate; culoarea de reacţie, galbenă-strălucitoare, permite interpretarea cu ochiul liber sau cu ajutorul unui spectrofotometru obişnuit; absorbanta maximă se realizează la 400mm;

— *peroxidaza* (obţinută din hrean), enzimă de asemenea activă; substratul cel mai des folosit, acidul 5-aminosalicilic+apă oxigenată, dă o culoare de reacţie maron-închis şi are absorbţia maximă la 449 nm; folosirea acestui substrat poate fi limitată de faptul că este carcinogen, deşi în condiţii normale de lucru nu sînt constatate accidente.

Materialele pe care se realizează adsorbţia elementelor de reacţie (antigen sau anticorpi) sînt reprezentate de *tuburi de polistiren*, cu dimensiunea optimă 11×55 mm, *plăci de microhemaglutinare* sau *bile de sepharose*. Proprietatea acestor materiale de a adsorbi elementele de reacţie trebuie să fie testată pentru fiecare sistem în lucru, aplicînd titrarea „în tablă de şah" cu antigene, antiseruri şi imunoglobuline conjugate standard.

Telguer (1978) a folosit beţe de polistiren, material care permite o mare economie de reagenţi, posibilitatea de efectuare rapidă a spălărilor şi de automatizare.

Soluţii tampon, substanţe şi materiale diverse. Conjugatele imunoglobulinice cu fosfatază alcalină. Se folosesc enzime avînd o concentraţie de 1 000 unităţi/mg proteină.

Diluţia de lucru a conjugatului se determină, înainte de folosire, prin testare în TIE direct faţă de imunoglobulina de specie cu care s-a preparat antiglobulina conjugată sau în TIE indirect, utilizînd antigenul care urmează să fie determinat.

Substratul folosit în cazul fosfatazei alcaline, 4-nitrofenilfosfat, este diluat 1 g/litru în tampon de dietanolamină 10%.

Diluţiile de antiser (*antiglobuline*) se realizează în soluţia tampon cu tween-20 sau tris-HC1 0,05 M, pH 7,4.

Este indicată adăugarea albuminei serice bovine, în proporţie de 5 g/litru, în scopul scăderii intensităţii colorării nespecifice de fond.

Efectuarea testului imunoenzimatic. Sensibilizarea (aderarea antigenului sau a anticorpilor la suprafaţa de polistiren a tuburilor sau a microplăcilor) se realizează prin incubarea reagentului respectiv (diluat în soluţia tampon carbonat-bicarbonat, pH=9,6) în funcţie de metoda aplicată, timp de 18—20 ore, la temperatura de 4°C sau timp de 3 ore la 37°C, cu tuburile fixate pe o placă rotatorie. Plăcile sau tuburile astfel pregătite pot fi păstrate, după spălare, la congelator (—70°C).

Plăcile sau tuburile se spală cu soluţie tampon, se usucă prin agitare lentă şi se folosesc imediat în continuare.

Scanned with OKEN Scanner

În tuburi sau plăci se repartizează serul (în care urmează să fie stabilită existenţa şi determinată concentraţia anticorpilor), diluat în tampon fosfat-tween 20, sau soluţia în care se cercetează prezenţa antigenului, diluat în aceeaşi soluţie tampon. Se incubează două ore la temperatura laboratorului.

După o nouă spălare, se repartizează conjugatul antiglobulinic (metoda pentru determinarea anticorpilor) sau conjugatul globulinic specific (metoda pentru determinarea antigenului), ambele în tampon fosfat-tween.

După o incubare la temperatura laboratorului sau la 4°C şi spălare se adaugă substratul enzimei folosite. Reacţia este oprită prin adăugarea NaOH. Timpul de hidroliză poate fi ales în funcţie de momentul realizării unui nivel prestabilit al absorbanţei pentru proba pozitivă sau de atingerea unei culori de intensitate convenabilă în toate tuburile (godeurile).

În final, se determină absorbţia conţinutului godeurilor (tuburilor) la un spectrofotometru obişnuit.

În cazul metodei de stabilire a prezenţei antigenului prin testul „competiţiei", după sensibilizarea suprafeţelor inerte cu imunoglobulina specifică şi spălare, se amestecă în mai multe proporţii soluţia de antigen care urmează să fie determinat cu antigenul cunoscut conjugat cu enzimă (în tampon fosfat-tween). După o incubare de 30 minute la temperatura laboratorului, se trece amestecul realizat în godeurile plăcilor sau în tuburi; se incubează 3 ore la temperatura laboratorului după care se spală. În continuare, se realizează aceiaşi timpi de reacţie ca şi în celelalte variante: repartizarea substratului, oprirea reacţiei şi citirea la spectrofotometru.

Interpretarea rezultatelor. Metoda cea mai convenabilă de citire a rezultatelor este reprezentată de exprimarea valorilor absorbanţei. În cazul testării prezenţei anticorpilor faţă de un antigen cunoscut, este util să se determine în prealabil o „valoare normală", reprezentînd titrul mediu al unui grup reprezentativ de animale normale din aceeaşi specie. Reacţii pozitive sînt considerate cele care depăşesc această valoare. Astfel, R u g m a n n şi col. (1977) consideră pozitive probele care depăşesc cu 15% valoarea medie a martorilor negativi.

Se poate utiliza de asemenea o curbă standard a valorilor obţinute prin titrarea unui antigen cunoscut. Valorile probelor necunoscute sînt stabilite pe baza valorilor corespondente ale curbei standard.

Pentru toate etapele realizării testului este necesar să se tatoneze în prealabil timpii de reacţie, temperaturile, concentraţiile reagenţilor, modalităţile de citire şi interpretare — pentru fiecare nou sistem antigen-anticorp introdus în lucru, atît în scop de diagnostic cît şi pentru realizarea unor lucrări de cercetare.

Aplicaţii. Deşi elaborat recent, TIE s-a impus prin calităţile sale indiscutabile şi ca urmare a fost aplicat de numeroşi cercetători pentru testarea prezenţei şi concentraţiei anticorpilor sau antigenelor; în numeroase cazuri TIE s-a dovedit util pentru diagnosticul unor afecţiuni specifice.

În bolile bacteriene, TIE a fost aplicat de C a r l s s o n şi col. (1972, 1975) pentru titrarea anticorpilor anti-*Salmonella* din seruri umane; antigenul folosit a fost extractul fenolic-apos, respectiv un lipopolizaharid obţinut din tulpini de tip A şi D. Testul s-a dovedit de pînă la 100 ori mai sensibil decît reacţia de aglutinare lentă şi reproductibil. Testul a fost folosit pentru stabilirea conţinutului în anticorpi anti-E coli în laptele de femeie (C a r l s s o n şi col., 1975) şi pentru determinarea anticorpilor anti-Bru-

Scanned with OKEN Scanner

cella (Engvall şi Carlsson 1976).

Superioritatea TIE faţă de testul tuberculinic pentru depistarea păsărilor infectate cu *Mycobacteriun avium* a fost demonstrată de Thoen şi col. (1977). Simon şi Terplan (1977) au evidenţiat enterotoxina B a stafilococilor cu ajutorul testului imunoenzimatic, iar Hurvell (1978) şi Carlsson şi col. (1976) reuşesc să diferenţieze, cu mare acurateţe, reacţiile serologice pozitive induse de *Brucella* faţă de cele rezultate în urma infecţiei cu *Yersinia enterocolitica*. TIE s-a dovedit a fi o metodă simplă şi foarte sensibilă pentru decelarea şi determinarea cantitativă a antitoxinei tetanice (Fey şi Stiffler—Rosenberg, 1977) şi a toxinei botulinice (Notermans şi col., 1978).

Testul imunoenzimatic a fost experimentat în unele *boli virotice*. Decelarea şi titrarea anticorpilor contra rotavirusului în colostrul de vacă au fost realizate de Ellens şi col. (1978); Saunders (1977) efectuează TIE în scopul decelării anticorpilor antipestoşi porcini, constatînd o bună corelare cu rezultatele obţinute prin metoda seroneutralizării şi existenţa reacţiilor încrucişate între virusul pestei porcine şi virusul diareei virale bovine.

Atanasiu şi col. (1977) au aplicat acelaşi test pentru evidenţierea rapidă a anticorpilor antirabici.

Brugmann şi col. (1977) au elaborat o tehnică imunoenzimatică pentru decelarea cantitativă a anticorpilor faţă de *Mycoplasma suipneumoniae* în serurile de porcine, demonstrînd specificitatea şi sensibilitatea deosebită a testului.

În domeniul bolilor parazitare, TIE a fost aplicat de numeroşi cercetători, pentru unele dintre aceste afecţiuni elaborîndu-se metode care sînt folosite în practică.

Pe prim plan în acest sens se situează *trichineloza*; TIE a fost aplicat pentru decelarea anticorpilor anti-*Trichinella*, la om şi la porc.

Antigenul folosit este reprezentat de un extract salin brut de larve.

TIE este folosit pentru diagnosticul altor parazitoze umane ca malaria, schistozomiaza, tripanozomiaza, filarioza, toxoplasmoza şi altele.

Recent, Burden şi Hammet (1978) au efectuat testări ale anticorpilor anti-*Fasciola hepatica* la taurine infestate experimental. Antigenul a fost reprezentat de un extract preparat din helminţi adulţi.

Pionon şi col. (1978) au aplicat variante ale tehnicilor imunoenzimatice în diagnosticul unor parazitoze ca bilharziosa şi trichineloza. Reacţiile efectuate au inclus trei etape: imunoprecipitarea pe acetat de celuloză prin imunoelectrodifuziune sau imunoelectroforeză dublă; contactul cu conjugatul imunoglobulinic; decelarea enzimatică a prezenţei anticorpilor marcaţi.

XII. 3.12. Testul imunoperoxidazei

Testul imunoperoxidazei este aplicat în ultimii ani în special în scopul decelării antigenelor virale în culturi celulare şi în secţiuni obţinute din ţesuturi şi organe.

Principiul metodei se bazează pe evidenţierea complexului antigen-anticorp printr-o tehnică histochimică.

Sensibilitatea metodei este cel puţin egală cu aceea a testului de imunofluorescenţă, faţă de care prezintă o serie de avantaje: prepararea relativ simplă a conjugatelor, restrîngerea proporţiei de reacţii nespecifice, stabilitatea reactanţilor marcaţi.

Materiale necesare — imunoglobuline specifice contra antigenului a

cărui prezenţă eventuală urmează să fie stabilită, marcate cu peroxidază (pentru tehnica directă);

— imunoglobuline specifice (marcate) faţă de serul speciei la care urmează să se efectueze teste pentru decelarea anticorpilor (în cazul metodei indirecte);

— antigenul, reprezentat în mod deosebit de culturile celulare sau de secţiunile din organe în care este prezent virusul.

Variante ale metodei. Ca şi în cazul testului de imunofluorescenţă sînt folosite două tehnici principale:

— *testul direct*, în care anticorpii antivirali marcaţi se cuplează cu antigenul;

— *testul indirect*, în care serurile de testat (nemarcate), cuplate cu antigenul cunoscut, reacţionează într-o a doua etapă cu globulinele anti-specie marcate.

Aplicaţii. Testul imunoperoxidazei a fost aplicat, cu bune rezultate, în diagnosticul febrei aftoase, turbării, leucozei enzootice bovine, gastroenteritei transmisibile a porcului, adenovirozelor, mixomatozei etc.

XII. 3.13. Testul cu radioalergosorbenţi (RAST)

Principiul metodei. Testul se bazează pe capacitatea antigenului (alergenului) cuplat la un suport insolubil corpuscular de a reacţiona cu anticorpii corespondenţi; realizarea complexului alergen + anticorpi specifici este evidenţiată prin reacţia dintre anticorpi şi anti- anticorpii marcaţi radioactiv.

Metoda a fost elaborată în scopul decelării IgE care este prezentă în cantităţi extrem de reduse în serul sanguin (valori de ordinul nanogramelor şi picogramelor).

Materiale necesare — Sephadex G_{25} superfin, celuloză microcristalină, Sepharose 4 B sau alt suport solid pentru cuplarea cu antigenul;

— ser anti-IgE, de preferinţă IgG anti-Fc al IgE din specia la care se efectuează cercetările;

— alergenul (alergenii);

— ser anti-fragment Fc (IgE) marcat cu iod radioactiv, avînd o activitate specifică de 50—100 μCi/nmol;

— tuburi din material plastic, micropipete, soluţii-tampon corespunzătoare;

— aparatură specială pentru dozarea radioactivităţii în probele cercetate.

În vederea preparării particulelor-suport cuplate cu antigen, acesta se amestecă cu suspensia aleasă; se incubează sub agitare continuă, se spală de cîteva ori şi se păstrează în soluţie tampon cu tween 20 şi albumină serică, putînd să fie folosit timp de cîteva luni de la data preparării.

Serul anti-IgE se prepară prin hiperimunizarea unui animal (iepure, capră) cu fragment Fc din IgE. În cazul în care este necesar, antiserul obţinut se absoarbe cu antigenele corespunzătoare.

Soluţia de anticorpi purificaţi se marchează cu I^{125}, prin metode ca cea cu cloramină T. Produsul marcat poate fi păstrat la congelator cel mult 1—2 săptămîni.

Efectuarea testului. Se incubează suspensia de particule + alergen cu serul care urmează să fie testat, sub agitare continuă. După cîteva spălări se adaugă soluţia de anticorpi anti-IgE marcaţi cu I^{125} care conţine şi imunoglobuline normale de iepure (în cazul în care serul anti-IgE a fost preparat pe iepure). Amestecul este incubat şi, în continuare, se elimină excesul de ser anti-IgE prin mai multe spălări.

Activitatea anticorpilor marcaţi, cuplaţi la complexul particule solide-alergen-IgE, se determină cu ajutorul unui contor de scintilaţie. Radioac-

Scanned with OKEN Scanner

tivitatea cuantificată este în raport direct cu concentrația imunoglobulinelor reaginice din serurile testate.

Sînt folosiți următorii martori de reacție:

— test cu ser martor avînd o concentrație cunoscută de IgE;

— test în care este folosit un ser martor negativ pentru IgE;

— test în care se introduc soluții-tampon în loc de serul pozitiv.

Interpretarea rezultatelor. RAST este un test semicantitativ, ale cărui rezultate sînt interpretate în comparație cu valorile unei curbe etalon obținute cu diluții seriate din serul martor pozitiv. După unii cercetători, rezultatele obținute în testul cu radioalergosorbenți se exprimă printr-o unitate de măsură special creată, unitatea sorbent; aceasta reprezintă captarea radioactivă pe imunosorbent la care se cuplează 1 picogram de IgE.

RAST oferă importante date cu privire la prezența anticorpilor reaginici contra anumitor antigene. În cele mai multe cazuri, rezultatele testării efectuate prin RAST indică valorile acestor proteine specifice, element util în stabilirea cauzelor unor stări de hipersensibilizare. Cu toate acestea, aplicarea acestui test are unele limite:

— nu sînt evidențiate reaginele față de alți alergeni, în afara celor introduși în testare și cuplați (în testări independente) la suportul solid;

— nu sînt decelate reaginele aparținînd altor clase de imunoglobuline;

— prezența reaginelor din alte clase implică realizarea unei competiții cu reaginele IgE, blocînd o parte dintre determinații antigenici ai alergenului și determinînd în acest fel găsirea unor valori ale IgE inferioare celor reale.

Totodată, rezultatele testării sînt influențate de calitatea (în special puritatea) și titrarea prealabilă a reagenților; se impune, în acest sens, standardizarea metodologiei, a alergenilor și a serurilor care participă la reacție.

Limitele testului cu radioalergosorbenți nu precumpănesc asupra valorii sale incontestabile care rezultă în primul rînd din sensibilitatea sa deosebită.

Aplicațiile metodei. Testul cu radioalergosorbenți este indicat în scopul determinării imunoglobulinelor reaginice din clasa IgE; evidențierea concentrației crescute și specificității acestora față de un alergen permite stabilirea etiologiei unor stări alergice. Lărgirea sferei de aplicare, inclusiv în domeniul medicinii veterinare, va crea posibilități mărite pentru diagnosticul unor stări patologice în care componenta alergică este implicată.

XII. 3.14. Testul imunoferitinei

Principiul metodei se bazează pe marcarea globulinelor specifice cu feritină, un marker electronodens care nu determină pierderea activității anticorpilor. Realizarea microprecipitării globulinelor marcate cu antigenul permite identificarea și localizarea acestuia prin examinare la microscopul electronic (fig. 52).

Efectuarea testului include conjugarea feritinei cu imunoglobulinele printr-un procedeu în două etape:

— fixarea unui agent de cuplare la feritină;

— conjugarea feritinei obținute cu anticorpii; în acest scop, imunoglobulina este adăugată la soluția de feritină în proporție de 1 : 4.

În continuare, se elimină anticorpii neconjugați prin centrifugări repetate la 100 000 g. După prima centri-

Scanned with OKEN Scanner

fugare, proteina conjugată sedimentată este reluată în tampon fosfat. Soluția rezultată după ultima centrifugare este incubată la rece în soluție tampon. Se elimină apoi feritina neconjugată prin electroforeză în bloc de amidon.

Conjugarea feritinei cu anticorpii se poate efectua și într-o singură etapă.

Înainte de utilizare prin examinare la microscopul electronic, conjugatul este controlat prin imunoelectroforeză.

La pregătirea probelor pentru tratare cu anticorpi conjugați cu feritină este necesar să se țină seama de trei factori importanți:

— menținerea structurilor celulare;

— păstrarea determinanților antigenici nemodificați;

— păstrarea moleculelor de feritină în celule.

Localizarea antigenelor de suprafață ale celulelor se poate realiza prin imersiunea secțiunilor în suspensie de imunoglobuline conjugate cu feritină.

Prin aplicarea unor metode speciale de pretratare a secțiunilor de țesuturi se poate determina localizarea antigenelor intracelulare. Procedeele respective au rolul de a „permeabiliza" membranele celulare, făcîndu-le astfel penetrabile pentru moleculele de imunoglobuline marcate cu feritină.

Metoda indirectă constă din incubarea prealabilă a probei (secțiunii de țesut) cu anticorpi nemarcați care se cuplează cu antigenele corespondente. După eliminarea excesului de anticorpi necuplați se aplică anticorpii contra imunoglobulinelor folosite în prima etapă (deci, contra imunoglobulinelor de specie, preparate prin hiperimunizarea altei specii de animal). Localizarea feritinei indică locul cuplării inițiale antigen-anticorp, deci localizarea antigenului.

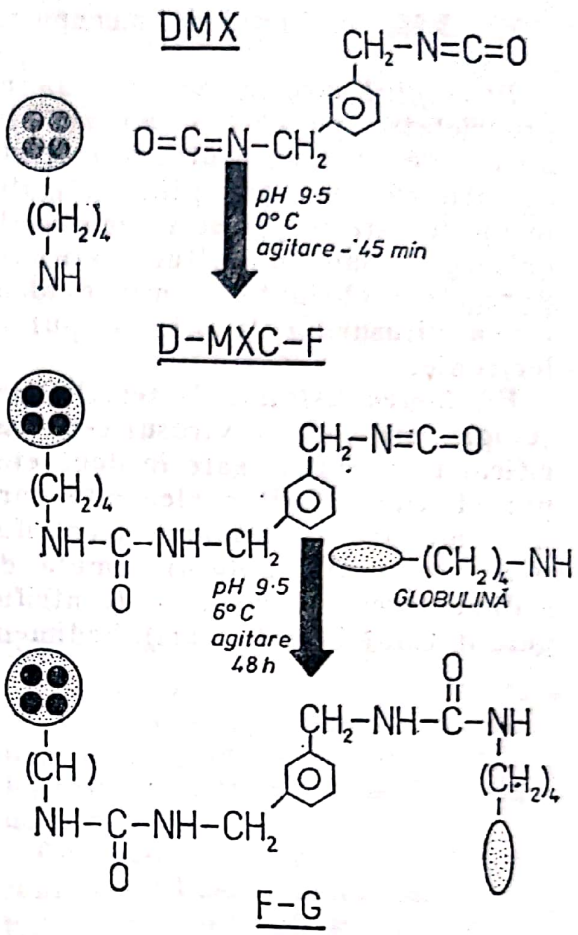


Fig. 52 — Mecanismul conjugării feritinei la molecula de globulină, folosind compusul XC ca factor de cuplare (după W e i r)

În acest fel, testul indirect poate fi utilizat pentru studiul mai multor anticorpi specifici.

În ambele variante ale metodei imunoferitinei, sînt folosiți martori adecvați: blocarea imună specifică a reacției, tratarea unor secțiuni cu conjugate cu feritină nespecifice, tratarea țesuturilor similare cu conjugate de feritină specifice.

Aplicații. Metoda imunoferitinei este în prezent larg aplicată la identificarea antigenelor virale (ca de exemplu în cazul virusului leucozei bovine — M i h ă i l e s c u și col., 1978); localizarea antigenelor de suprafață ale bacteriilor, hematiilor; cercetările cu privire la mecanismele imunologice implicate în unele boli etc.

Scanned with OKEN Scanner

XII. 3.15. Testul de imunomicroscopie electronică

Principiul metodei se bazează pe proprietatea pe care o au serurile antivirale (cu o concentrație ridicată de anticorpi) de a precipita particulele virale care se găsesc în materiale patologice sau în culturi celulare. Agregatele obținute permit evidențierea virusurilor la microscopul electronic.

Efectuarea testului. Materialul patologic care conține virusul este clarificat prin centrifugare în două etape: eliminarea altor elemente care pot îngreuna examinarea (centrifugarea la turație redusă) urmată de sedimentarea virusului (centrifugare la turații foarte mari). Sedimentul obținut se reia la un volum de 1 : 20—1 : 30 față de cel inițial. Un volum de suspensie virală se amestecă cu un volum de ser antiviral și se păstrează la temperatură scăzută, 18—20 ore. Amestecul este apoi tratat cu fosfotungstat de sodiu, după care este tratat într-un mod adecvat pentru examinare la microscopul electronic.

Aplicații. Testul de imunomicroscopie electronică a fost aplicat cu rezultate deosebit de bune în decelarea unor virusuri ca cel al bronșitei infecțioase, coronavirusurile, parvovirusurile etc.

Scanned with OKEN Scanner

XIII Imunoprofilaxia

XIII. 1. Evoluție și cadru

Imunoprofilaxia reprezintă acțiunile de prevenire a bolilor prin conferirea unei imunități la animalele receptive cu ajutorul vaccinurilor și serurilor. Ea este denumită și profilaxie specifică datorită specificității imunității induse pentru un anumit agent cauzal.

Imunitatea conferită artificial de intervenția omului, prin acțiuni imunoprofilactice, poate fi activă și pasivă. Imunitatea activă se obține prin administrarea de vaccinuri, organismul elaborîndu-și anticorpii sub acțiunea antigenului vaccinal. Imunitatea pasivă este conferită prin administrarea de seruri sau concentrate globulinice conținînd anticorpi preparați pe alte animale.

Limitată inițial la domeniul bolilor infecțioase, în care își găsește dealtfel cea mai largă aplicabilitate, imunoprofilaxia s-a extins treptat și în alte domenii ale patologiei în care s-a demonstrat rezistența prin mecanisme imune, oferind astăzi, posibilități eficace de luptă în diferite boli parazitare și în unele intoxicații cu toxalbumine.

Se poate conchide că marii flageli ai creșterii animalelor din trecutul nu prea îndepărtat (febra aftoasă, pesta bovină, pesta porcină, pseudopesta, turbarea, antraxul, rujetul etc.) pot fi astăzi bine stăpîniți, în prevenirea și combaterea lor acțiunile imunoprofilactice avînd un rol hotărîtor, dispunînd de vaccinuri de o mare eficiență.

Cu toate realizările obținute de-a lungul unui secol de căutări, imunoprofilaxia continuă să se confrunte cu o problematică destul de complexă. Astfel, rămîne de rezolvat găsirea unor produse biologice imunogene într-o serie de boli infecțioase, aprofundarea cunoștințelor de genetică microbiană, perfecționarea metodelor de preparare, concentrare și purificare a antigenelor și folosirea unor adjuvanți care stimulează răspunsul imun, constituind premisele unui optimism justificat.

Pe de altă parte, imunoprofilaxia trebuie să se adapteze cadrului nosologic nou, al patologiei infecțioase actuale. Succesele spectaculare în unele boli majore au ocazionat ecloziunea altor boli, voalate anterior de marile contagiuni. De asemenea, traficul intens și adeseori insuficient controlat de animale și produse de origine animală, survenit pe plan mondial mai ales în ultimele decenii, a dus la o largă răspîndire a unor boli noi sau cunoscute ca avînd un specific

Scanned with OKEN Scanner

loco-regional şi cu care numeroase ţări trebuie să se confrunte în prezent (pesta porcină africană, boala veziculoasă, blue-tongue, leucozele mamiferelor etc.). Selecţionarea unor rase de animale perfecţionate, de mare precocitate şi productivitate, crearea unor unităţi zootehnice cu mari densităţi de animale şi industrializarea proceselor de creştere au determinat profunde modificări ecobiologice, cu apariţia unor stări patologice noi, exprimate frecvent ca enteropatii sau pneumopatii ale animalelor tinere şi etichetate ca „boli de civilizaţie", „tehnopatii", „boli de aglomeraţie", „boli ale viitorului" etc. Particularităţile acestor boli faţă de cele „clasice" sînt următoarele:

— apar ca boli polifactoriale, fiind determinate de acţiunea concomitentă a unor factori nespecifici (alimentari, igienici, tehnologici, de stres etc.) şi a unor agenţi microbieni;

— au frecvent caracter polietiologic, fiind provocate de acţiunea sinergică a unor asociaţii virusuri-bacterii. În cazul etiologiei bacteriene unice (frecventă la animalele nou-născute), ele sînt consecinţa pasării germenilor pe animale cu dificit imunoglobulinic sau a transformării germenilor în urma folosirii antibioticelor cu acţiune de presor selectiv.

— tabloul lor anatomo-clinic permite rareori să se stabilească un diagnostic precis, iar transmiterea lor experimentală este dificilă;

— imunitatea postinfecţioasă variază în limite foarte largi, datorită multiplicităţii etiologice a aceloraşi sindroame. Acelaşi motiv face ca imunizarea dirijată, obţinută prin vaccinuri, să se soldeze cu rezultate foarte diferite, fiind greu de apreciat valoarea imunogenă a produselor biologice utilizate în astfel de boli.

În această problematică nouă de patologie, imunoprofilaxia este chemată să rezolve prepararea de noi antigene vaccinale şi creşterea eficienţei vaccinurilor prin inducerea unor răspunsuri imune superioare din partea organismului.

XIII. 2. Principii de imunoprofilaxie cu seruri imune şi gammaglobuline

XIII. 2.1. Imunizarea pasivă

Imunizarea pasivă este un important mijloc de prevenire şi tratament al bolilor şi constă în conferirea unei imunităţi imediate şi de scurtă durată prin administrarea parenterală sau orală de anticorpi proveniţi de la un animal imun.

Produsele biologice utilizate pentru imunizarea pasivă a animalelor prin administrări parenterale sînt fie serurile imune, fie gammaglobulinele specifice, obţinute din seruri imune. Imunitatea conferită pe cale orală se realizează obişnuit la animalele nou-născute, prin transmiterea gammaglobulinelor colostrale (la păsări anticorpii vitelini) de la mame imunizate activ. O modalitate oarecum particulară de conferire a rezistenţei pasive, mai ales la animalele nou-născute cu deficit imunoglobulinic, constă în administrarea de sînge, ser sanguin, ser colostral sau extracte gammaglobulinice din ser sanguin sau colostru de la animalele adulte.

Serurile imune sînt biopreparate reprezentate de serul sau plasma sanguină de la animale imunizate special în acest scop (hiperimunizate).

Scanned with OKEN Scanner

Ele pot fi obţinute şi de la animale imunizate natural, prin trecerea prin boală, purtînd în acest caz denumirea de *seruri de convalescent*.

Serurile imune, preparate în biofabrici pe animale hiperimunizate, denumite şi seruri hiperimune, au cea mai largă utilizare, fiind produse standardizate caracterizate prin conţinut mai bogat în anticorpi şi o eficacitate prestabilită prin titrare, folosindu-se după prescripţii exacte. De asemenea, este larg răspîndită protecţia colostrală a nou-născuţilor prin vaccinarea animalelor gestante. În unele boli infecţioase, serurile imune sau gammaglobulinele specifice continuă să rămînă un important mijloc terapeutic.

Datorită faptului că anticorpii nu au putut fi pînă în prezent sintetizaţi decît de sistemul imun al organismelor vii, obţinerea lor pentru aplicaţii practice impune folosirea animalelor donatoare de ser. Pe de altă parte, obţinerea de seruri imune cu utilizări la om şi diferite specii de animale, pe anumite animale donatoare este posibilă, datorită nespecificităţii imunoglobulinelor, anticorpii produşi de donatori dintr-o specie neutralizînd antigenul corespondent (toxină sau microorganism) de la om sau alte specii de animale.

Prepararea serurilor imune se bazează în principiu pe administrarea unor doze mari şi repetate de antigen la animalele donatoare. Atunci cînd imunizarea animalelor producătoare de ser se realizează cu anatoxine, serurile obţinute se numesc şi seruri antitoxice sau *antitoxine*. Hiperimunizarea donatorilor se traduce printr-un răspuns imun intens, exprimat prin valori ridicate ale anticorpilor serici, valori ce depăşesc cu mult pe cele existente la animalele imunizate spontan, prin trecerea prin boală, sau la animalele vaccinate.

Principiile şi metodele de hiperimunizare în scopul obţinerii de seruri imune sînt foarte numeroase, în funcţie de produsul de obţinut, animalul donator, antigen, mod de încărcare etc., ca şi de rutina biofabricilor, ele fiind cuprinse în protocoalele de preparare a fiecărui ser.

În general, ca animale donatoare se folosesc caii, bovinele, ovinele şi porcii. Calul este donatorul preferat şi folosit pe scara cea mai largă, oferind avantajul de a reacţiona la un număr mare de antigene şi de a dona o cantitate mare de sînge. De asemenea, serurile preparate pe cal sînt relativ bine suportate şi de om (Horsch şi col., 1977). Taurinele, ovinele şi porcii se folosesc la prepararea serurilor fie faţă de agenţi cu patogenitate strictă de specie (ser antipestos porcin pe porc, ser contra febrei aftoase pe biongulate etc.), fie pentru limitarea reacţiilor anafilactice la animalele la care se foloseşte serul obţinut. Utilizarea animalelor de talie mică şi a celor de laborator la prepararea serurilor imune pentru uz profilactic şi terapeutic este de excepţie, cantităţile mici de sînge obţinut făcînd procedeul neeconomic. Pe aceste animale se pot prepara serurile folosite în cantităţi reduse, în teste imunologice de diagnostic.

Animalele donatoare sînt obişnuit animale convenţionale, ele trebuind să corespundă unor cerinţe deosebite, prevăzute în protocoalele de preparare. Astfel, ele trebuie să fie sănătoase şi să provină din efective libere de boli infecţioase, fiind supuse unui examen minuţios pentru excluderea infecţiilor oculte, transmisibile prin ser (de ex. anemie infecţioasă, leucoză bovină etc.).

Pentru fiecare ser imun trebuie alese formele de antigen, dozele folosite şi căile de administrare cele mai adecvate (Muray, 1973; Ţibrea, 1974).

Prima sau primele 2—3 inoculări de pregătire în vederea hiperimunizării se fac obişnuit cu vaccin, restul inoculărilor („de încărcare") făcîndu-se cu germeni virulenţi sau cu toxine, în doze mărite progresiv. Ritmul administrării antigenului, ca

Scanned with OKEN Scanner

și momentul optim al recoltării sîngelui condiționează valorile anticorpilor serici obținuți (Ț i b r e a, 1974). La animalele donatoare la care se practică sîngerări parțiale, este necesară reîncărcarea antigenică la anumite intervale înainte de recoltări, sub formă de „doze de împrospătare" sau „rememorare", pentru a menține nivelul anticorpilor la valori ridicate și a exploata donatorii în condiții optime cît mai mult timp.

Sîngerarea se face prin venisecție în recipiente sterile. Serul imun se obține fie ca plasmă sanguină (recoltare în baloane cu perle pentru defibrinare sau pe substanțe anticoagulante și separarea plasmei prin centrifugare), fie ca ser (prin coagularea sîngelui și separarea serului).

Produsului final i se adaugă pentru conservare fenol și se ambalează steril, recoltîndu-se eșantioane pentru controlul calității.

Serul de convalescent este serul imun obținut de la donatori care s-au imunizat față de un anumit antigen în condiții naturale, în urma trecerii prin boală. În general, serul de convalescent este folosit ca ser homolog, la animalele din aceeași specie, evitîndu-se prin aceasta riscurile unor reacții anafilactice.

Prepararea se face prin sîngerări parțiale, cu respectarea regulilor de asepsie. Existența unor variații mari ale titrurilor de anticorpi la animalele trecute prin boală poate fi suplinită prin amestecarea serurilor de la mai mulți donatori și folosirea unor doze cît mai mari (minimum 1 ml/kg greutate corporală).

Serurile de convalescent au fost folosite în trecut mai ales în combaterea febrei aftoase, serumizarea de necesitate a tineretului (viței, purcei) sau a animalelor adulte, apreciate ca fiind mai sensibile, preîntîmpinînd formele grave de boală. În condițiile unităților zootehnice de tip semiintensiv, serurile au o utilizare din ce în ce mai limitată și numai în cazurile unde nu se dispune de alte posibilități de intervenție (K o h l e r, 1977). În îngrășătoriile de taurine de tip baby-beef, serul de convalescent recoltat de la viței din faza II și utilizat la vițeii nou introduși în unitate, reduce morbiditatea și pierderile prin moarte și sacrificări cauzate de pneumopatii (P o p o v i c i u, 1978).

În prepararea și folosirea serului de convalescent o atenție deosebită trebuie acordată evitării pericolului transmiterii unor boli oculte, ai căror agenți pot fi prezenți în torentul circulator (virusul anemiei infecțioase, virusul leucozei bovine etc.), certitudinea indemnității efectivului, atestată de o supraveghere corespunzătoare prin testări imunologice repetate, reducînd mult acest pericol.

Serul și sîngele ca atare sau citratat, obținute de la animalele adulte, pot fi utilizate în condiții asemănătoare serului de convalescent, pentru ridicarea rezistenței în unele boli ale tineretului (A d a m e ș t e a n u, 1968; V i o r și col., 1979). Anticorpii din sîngele animalelor adulte, corespondenți microbismului local constituit din germeni condiționat patogeni, pot suplini deficitul imunologic al nou-născuților, protejîndu-i de agresiuni microbiene.

Principii generale de control al serurilor imune. Prepararea serurilor imune se realizează în biofabrici, pe animale sănătoase și judicios alese, conform unor metodologii standardizate prevăzute în protocolul de preparare a fiecărui ser. Produsele obținute, pentru a corespunde necesităților de folosire în prevenția și tratamentul bolilor, trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

— să fie active, adică să aibă o anumită capacitate neutralizantă față de germenul sau toxina cu care a fost preparat; aprecierea activității antiinfecțioase sau antitoxice se face

prin titrare, după anumite tehnici sau metode;

— să fie inofensive pentru animalele la care se utilizează, adică să nu conţină microorganisme sau alte substanţe nocive.

Controlul calităţii serurilor imune sub raportul sterilităţii, inocuităţii şi eficacităţii se face, ca pentru toate biopreparatele dealtfel, de către Laboratorul de Control al produselor biologice şi medicamentoase de uz veterinar. Pentru fiecare ser imun în parte sînt legiferate atît metodologia de control, cît şi condiţiile de calitate pe care produsul trebuie să le îndeplinească.

Controlul sterilităţii (bacteriologice şi fungice) se face prin însămînţări din eşantioanele recoltate din fiecare şarjă, pe medii de cultură. Inocuitatea se verifică prin inoculări la animale de experienţă, la care se urmăreşte reacţia locală, starea generală şi eventual alte aspecte.

Examenul principal în controlul serurilor imune îl constituie stabilirea valorii lor neutralizante sau protectoare prin titrare. Titrarea se poate face *in vitro* (serofloculare în cazul serurilor antitoxice; seroneutralizarea efectului citopatic pentru unele seruri antivirale) sau *in vivo*, pe animale de experienţă. Titrarea pe animale este în general cea mai concludentă şi constă în stabilirea cantităţii minime de ser capabilă să oprească dezvoltarea unei infecţii sau intoxicaţii făcute simultan, înainte sau după injectarea serului. Cu cît această cantitate este mai mică, cu atît serul este mai activ. Pentru fiecare ser trebuie aleasă o anumită specie de animale pe care să se facă titrarea. Astfel, serul antitetanic şi anticărbunos se pot titra pe şoareci şi cobai, serul antirujetic pe şoareci şi porumbei etc. Serurile antivirale pentru virusuri cu patogenitate strictă de specie (de ex. serul antipestos porcin) se titrează numai pe animale din specia respectivă. Rezultatele titrărilor pot fi influenţate într-o măsură mai mare sau mai mică de diferiţi factori (greutatea şi vîrsta animalelor, sezon etc.).

Pentru unele seruri imune au fost elaborate de către anumite laboratoare specializate preparate standard (etaloane standard), condiţionate prin liofilizare pentru conservarea lor un timp cît mai îndelungat. Valoarea preparatelor standard este exprimată în unităţi (unităţi internaţionale sau unităţi de protecţie), o unitate reprezentînd valoarea biologică specifică a unei anumite cantităţi dintr-un etalon. De exemplu, etalonul de ser antitetanic preparat de Institutul de Seruri din Copenhaga este livrat în fiole de 47 mg, cu un conţinut total de 1400 U.I., o unitate fiind reprezentată de 0,03384 mg. Standardul internaţional pentru serul antipestos porcin preparat de Laboratorul Central Veterinar Weybridge — Anglia, este livrat în fiole de 87,9 mg produs, cu un conţinut total de 1000 U.I., o unitate corespunzînd la 0,89 mg, iar standardul pentru serul antirujetic preparat de acelaşi institut conţine 87,9 mg produs şi respectiv 628 U.I. într-o fiolă, o unitate echivalînd cu 0,14 mg produs.

Elaborarea etaloanelor standard a făcut posibilă standardizarea metodelor de titrare şi de exprimare a valorii produselor în unităţi internaţionale, controlul unui ser făcîndu-se comparativ cu standardul, în condiţii experimentale identice. Această verificare comparativă garantează că unele variaţii ce nu pot fi prevăzute sau percepute exact în desfăşurarea titrării, nu prezintă influenţe asupra fidelităţii rezultatelor controlului şi a exprimării valorii sau eficacităţii produsului controlat.

Pentru controlul de rutină laboratoarele de specialitate îşi pot prepara standarde naţionale, folosite în activitatea curentă.

Scanned with OKEN Scanner

Principii de utilizare a serurilor imune. În condiţiile aplicării în practică a protecţiei prin mijloace de imunizare pasivă trebuie avute în vedere următoarele aspecte principale:

a) protecţia se instalează imediat după administrarea anticorpilor şi durează 2—3 săptămîni. Durata protecţiei este mai mare la serurile homoloage comparativ cu cea conferită de seruri heteroloage cu acelaşi conţinut în anticorpi. De asemenea, serumizările repetate duc la scurtarea perioadei de protecţie;

b) serurile imune heteroloage (xenogene), datorită proteinelor străine pe care le conţin, sînt recunoscute de către sistemul de recepţie imunologică al animalelor la care se administrează drept substanţe antigenice, inducînd răspuns imun. Această acţiune face posibilă apariţia unor reacţii alergice imediate în cazul imunizărilor pasive repetate (boala serului, şoc anafilactic). Astfel de reacţii sînt evitate prin folosirea unui ser imun homolog (alogen);

c) în cazul administrării unor vaccinuri la animalele aflate sub protecţie pasivă prin anticorpi corespondenţi antigenului vaccinal, poate avea loc o neutralizare parţială sau totală a stimulului antigenic şi o frînare trecătoare a anticorpogenezei (P o p o v i c i, I. şi col., 1954).

În trecutul nu prea îndepărtat, cînd practica medicală era axată predominant pe latura curativă şi cînd imunoprofilaxia nu dispunea de metode de imunizare activă eficace, serurile imune şi-au găsit o largă utilizare, atît în tratamentul unor boli cît şi în prevenirea lor prin serumizări sau serovaccinări. Orientarea actuală a luptei antiepizootice caracterizată prin intensificarea acţiunilor de prevenire a bolilor şi perfecţionarea concomitentă a mijloacelor imunoprofilactice prin elaborarea unor vaccinuri de mare eficienţă, au condus la reducerea importanţei şi limitarea folosirii serurilor imune, mai ales a serurilor antibacteriene şi antivirale. Serurile antitoxice rămîn încă de mare utilitate în prevenţia de necesitate sau terapia unor boli deosebit de grave la om şi animale (tetanos, anaerobioze, gangrenă gazoasă, botulism, muşcături de şerpi veninoşi etc.).

Aplicarea în practică a serurilor imune trebuie să se facă în conformitate cu instrucţiunile de folosire ale fiecărui produs şi care însoţesc în mod obligatoriu produsele biologice.

În principiu, administrarea serurilor se face pe cale parenterală (subcutanată, intramusculară, intraperitoneală, intravenoasă, subdurală etc.). Calea intravenoasă asigură imunizarea imediată a animalului, fiind preferabilă în serumizările aplicate în scop terapeutic. Administrarea intravenoasă este riscantă pentru serurile heteroloage, putînd genera şocuri anafilactice brutale. Calea subcutană este cea mai comodă şi mai tolerabilă, absorbţia anticorpilor în organism fiind însă mai lentă, putînd dura 1—3 zile. Administrarea subcutană este recomandabilă în serumizările profilactice (preventive). Calea intramusculară şi cea intraperitoneală sînt intermediare în ceea ce priveşte durata de resorbţie a anticorpilor. Administrarea perorală a serurilor imune este improprie atunci cînd se urmăreşte un efect preventiv sau curativ general şi care presupune prezenţa anticorpilor în sînge. După administrările *per os* anticorpii sînt degradaţi prin cenzura proteinoclazică (C h i ş i u N., 1970), odată cu celelalte proteine serice, de către fermenţii tubului digestiv, în special de pancreatină şi secreţiile epiteliului intestinal. Ea poate fi totuşi folosită la animalele nou-născute, la care mucoasa intestinală este permeabilă pentru anticorpi (R e j u e k 1968; D r a g a n o v şi col., 1972). Această cale imită natura şi asigură şi un efect local (P o p e s c u, A.,

1964; Willinger H., 1970), putînd avea o indicaţie majoră în tratamentul enteropatiilor (Glaisching şi col., 1970).

În ceea ce priveşte mecanismul de acţiune şi, legat de acesta, eficienţa intervenţiilor cu ser, în cazul infecţiilor bacteriene şi virale seroprevenţia aplicată la animalele sănătoase, chiar dacă acestea sînt contaminate şi se găsesc în perioada de incubaţie a infecţiei, preîntîmpină exprimarea clinică a bolii. De asemenea, efectul terapeutic al serului aplicat precoce, înaintea instalării unor simptome grave sau a unor leziuni ireversibile sau incompatibile cu viaţa, poate influenţa favorabil prognosticul bolii. În bolile în care agentul morbigen este un factor toxic (tetanos, botulism etc.), trebuie avut în vedere faptul că toxinele se fixează pe celule cu o viteză apreciabilă, de cîteva ore şi că odată fixate, sînt nedisociabile. Incapacitatea antitoxinelor de a neutraliza toxinele fixate limitează efectul preventiv al serurilor antitoxice în cazul administrării lor după o prealabilă contaminare şi modifică destul de puţin prognosticul în cazul aplicării terapeutice.

În situaţii speciale, de existenţă a unei pluralităţi antigenice a factorului toxic (intoxicaţii botulinice, muşcături de şerpi veninoşi), folosirea precoce a unei antitoxine polivalente este soluţia cea mai recomandabilă (Horsch, 1977).

XIII. 2.2. Principii de imunoprofilaxie prin gammaglobuline

Gammaglobulinele sau imunoglobulinele sînt biopreparate constituite de proteinele cu funcţii de anticorp, obţinute prin diferite procedee de extracţie din serul sanguin sau colostru. Ele se aplică, în principiu, după aceleaşi indicaţii ca şi serurile, prezentînd însă unele avantaje pe care serurile nu le au şi dintre care cele mai importante sînt:

— conţin anticorpii sub formă concentrată, fapt ce le asigură o eficienţă curativo-profilactică mărită;

— conţin anticorpii sub formă purificată, extracţia eliminînd proteinele de balast. Prin aceasta, preparatele gammaglobulinice sînt lipsite de nocivitatea acţiunii nespecifice a serurilor, de a induce sensibilizări sau reacţii anafilactice.

După calităţile substratului din care se prepară, gammaglobulinele sînt clasificate în 2 grupe principale şi anume:

a) gammaglobulinele specifice obţinute din seruri imune (seruri hiperimune sau de convalescent,) caracterizate printr-un nivel ridicat de imunoanticorpi specifici antigenului;

b) gammaglobuline normale (numite şi standard sau stock), obţinute din ser sau colostru de la indivizi sănătoşi, cu o zestre imunologică normală. Ele conţin o gamă largă de anticorpi, în concentraţii mai mult sau mai puţin ridicate, corespunzători antigenelor cu care donatorii au venit în mod natural în contact, în timpul vieţii.

O a treia grupă, cu o poziţie intermediară, ar putea-o reprezenta gammaglobulinele „de focar", obţinute din sîngele sau colostrul recoltate de la animalele adulte şi care, aplicate la tineretul susceptibil din aceeaşi unitate, au o eficienţă superioară gammaglobulinelor normale (Buchmann, 1968).

Metodele de preparare a gammaglobulinelor. Obţinerea gammaglobulinelor este condiţionată de existenţa unei surse de anticorpi, reprezentată de sîngele sau colostrul animalelor. În cazul gammaglobulinelor speci-

Scanned with OKEN Scanner

fice sînt necesare animale imunizate față de un anumit antigen, fie artificial prin hiperimunizare, fie natural, în urma trecerii prin boală.

Obținerea gammaglobulinelor normale este mult mai ușor de realizat, atît practic cît și economic, utilizînd ca materie primă fie serul sanguin rezultat din sîngerările de abator, fie serul sanguin sau colostrul recoltat de la animale din focarele de boală. Pentru prepararea gammaglobulinelor colostrale se recomandă utilizarea colostrului obținut de la primele 2—3 mulsori după fătare, fiind cel mai bogat în anticorpi. Colostrul se supune în prealabil degresării și îndepărtării cazeinei, serul colostral obținut fiind folosit apoi ca materie primă (P o p e s c u, A., 1975).

Prepararea se poate face industrial, în unități specializate sau în institute de biopreparate.

Tehnologiile de preparare a gamaglobulinelor au la bază fie sporirea forței ionice a mediului de diluție cu ajutorul unor săruri neutre, fie diminuarea forței ionice a mediului și precipitarea la punctul electric, fie micșorarea constantei dielectrice prin alcool etilic, fie precipitarea cu ioni metalici (aluminiu, zinc) sau cationi organici.

Procedeele cele mai utilizate și eficiente în obținerea preparatelor gammaglobulinice sînt:

a) *Metoda sporirii forței ionice a mediului de diluție* („salting-out") se bazează pe proprietatea unor săruri neutre de a avea afinitate mai mare pentru moleculele de apă decît seroproteinele, moleculele proteice fiind deshidratate și depuse sub forma unui precipitat. Procesul este reversibil, seroproteinele precipitate redizolvîndu-se în apă.

Dintre sărurile neutre (sulfați, fosfați, citrați) cele mai bune rezultate se obțin cu sulfatul de amoniu, datorită solubilității lui mari în apă, procedeul fiind introdus în numeroase institute în producția industrială. Pentru îndepărtarea unor impurități (în special în zona beta și alfa), produsul rezultat poate fi purificat fie prin eliminarea proteinelor neanticorp prin absorție pe hidroxid de aluminiu, fie prin repetarea precipitării cu o soluție 33% sulfat de amoniu. Produsul final conține atît IgG cît și IgM, în stare aproape pură (M a r t i n s s o n, 1970; P o p e s c u, 1975).

În comparație cu alte procedee, precipitarea cu sulfat de amoniu este o metodă mai blîndă, fără implicații în denaturarea structurală sau de acțiune a anticorpilor, produsul obținut putînd fi aplicat în anumite condiții și pe cale intravenoasă.

Pentru cerințele practicii pot fi livrate produse obținute după prima treaptă, renunțarea la purificare permițînd scăderea prețului de cost (S i t a r s k a și col., 1968);

b) *metoda micșorării constantei dielectrice a mediului* cu ajutorul unor solvenți organici („salting-in"). Ca solvenți organici se folosește obișnuit alcoolul etilic sau metilic. Alcoolul etilic diminuează disociația electrolitică a sărurilor din soluție, deshidratînd și depolarizînd moleculele de proteină. Seroproteinele astfel modificate precipită datorită creșterii corespunzătoare a forțelor electrostatice de atracție. Datorită degradării seroproteinelor anticorp de către alcool, acțiune ce se reduce progresiv cu coborîrea temperaturilor la care se face extracția, operațiunile de amestec și precipitarea trebuie să se efectueze între —5° și —10°C.

Metoda precipitării cu alcool etilic permite obținerea unor preparate gammaglobulinice de înaltă puritate electroforetică, la un randament ridicat și de mare eficacitate, procedeul fiind recomandat de O. M. S. cu prioritate. Metoda este însă mai pretențioasă în industrializare, necesitînd menținerea cu stricteță a lan-

Scanned with OKEN Scanner

ţului frigorific pe tot parcursul extracţiei.

Cu avantajele şi dezavantajele menţionate, ambele procedee şi-au atestat eficacitatea, permiţînd obţinerea unor preparate gammaglobulinice cu 16 g/100 ml proteină, concentraţia în anticorpi fiind de 10—20 de ori mai mare decît în produsele de origine. Ambele metode asigură obţinerea unor biopreparate lipsite de contaminare virală decelabilă (Bul. O. M. S., 1967), aspect deosebit de important în cazul preparării de gammaglobuline normale, pentru care materia primă poate proveni de la animale purtătoare de cele mai diverse microorganisme. Alegerea metodei depinde de dotarea laboratorului şi egixenţele de calitate (puritate) ale produsului, precum şi de considerentele economice desprinse din folosirea lui în producţie.

Controlul de calitate al gammaglobulinelor specifice se face de către Laboratorul de control de Stat al produselor biologice, după principii identice celor menţionate la controlul serurilor imune, completat cu verificarea concentraţiei şi purităţii.

Pentru controlul gammaglobulinelor normale, Comitetul de experţi O. M. S. (1967) recomandă următoarele teste:

— controlul concentraţiei şi purităţii prin electroforeză (se efectuează la o soluţie 1% proteină în soluţie tampon la pH 8,6 şi forţă ionică 0,1). Soluţiile gammaglobulinice trebuie să conţină 10—17 g/100 ml proteină totală, cu minimum 90% gammaglobuline;

— controlul pH-ului; pH-ul soluţiei trebuie să aibă valorile de 6,8± 0,4;

— controlul sterilităţii (probele însămînţate pe medii uzuale pentru germeni aerobi, anaerobi şi ciuperci să nu genereze dezvoltarea de culturi);

— controlul inocuităţii prin inoculări la animale de experienţă (0,5 ml la şoareci şi 5 ml la cobai). În timpul observaţiei de 7 zile a animalelor inoculate, nu trebuie să se înregistreze reacţii generale sau locale;

— testul stabilităţii: probele din produsul final menţinute 4 ore la temperatura de 57°C nu trebuie să se gelifice;

— controlul activităţii, prin titrarea anticorpilor specifici, comparativ cu a serului din care s-a obţinut. Testul trebuie să ateste corectitudinea extragerii, fiind recomandabil ca preparatul gammaglobulinic să aibă o concentrare a imunoanticorpilor de cel puţin 10 ori mai mare decît a serului de origine;

— testul pirogenităţii (inoculare intravenoasă la iepuri adulţi).

Pentru gammaglobulinele normale, destinate utilizărilor la animale, controlul poate fi simplificat şi limitat la aprecierea purităţii electroforetice şi a concentraţiei procentuale în gammaglobulină, precum şi a inocuităţii, restul examenelor enunţate fiind facultative.

Este important de subliniat faptul că controlul calităţii gammaglobulinelor normale nu poate prestabili valoarea lor curativoprofilactică. Testarea activităţii bactericide sau bacteriostatice nu stabileşte relaţii directe cu rezistenţa la infecţie a animalelor tratate cu gammaglobuline, permiţînd determinarea capacităţii lor protectoare *in vivo* (G a y, 1965). Nivelul anticorpilor specifici din aceste preparate este foarte variabil, condiţionat de zestrea imunologică particulară şi foarte diferită a animalelor de la care s-a obţinut materia primă (H e i n, 1967; P o p e s c u, A., 1963 şi 1964). Testele de seroprotecţie pe şoareci, efectuate mai ales faţă de *E. coli*, au dat rezultate variate (M e e s e, 1965). Pentru toate aceste motive, controlul produselor gammaglobulinice normale trebuie să certifice în principal conţinutul în imunoglobuline şi inocuitatea lor.

Scanned with OKEN Scanner

Preparatele gammaglobulinice îşi conservă proprietăţile un timp foarte îndelungat, mai ales în cazul păstrării la temperatura frigiderului. Popescu şi col. (1973) au constatat că preparatele gammaglobulinice bovine şi porcine păstrate la frigider, nu şi-au modificat concentraţia relativă a serofracţiunilor şi nici spectrul imunoelectroforetic după 3 ani de la preparare.

Principii de utilizare a preparatelor gammaglobulinice. În cazul gammaglobulinelor specifice, principiile de utilizare sînt identice cu cele ale serului imun respectiv, recomandările fiind bazate pe conţinutul şi activitatea neutralizantă a produsului faţă de agentul cu care s-au preparat, testate prin controlul de calitate. Ele sînt utile şi recomandabile în prevenţia bolilor pentru care serurile imune, în cantităţi administrabile, nu conţin anticorpi la valorile necesare realizării unei eficienţe curativo-profilactice (boala lui Aujeszky, colibaciloza, pneumopatii la tineretul taurin etc.). Este de reţinut faptul că nivelul anticorpilor foarte ridicat în preparatele imunoglobulinice, este limitat la speciile şi serotipurile microbiene cu care s-a făcut imunizarea, fapt ce duce la menţinerea unei activităţi strict specifice. Popescu şi col. (1971/72) au obţinut un preparat gammaglobulinic anticolibacilar din sînge de la taurine imunizate, conţinînd 90% imunoglobuline.

La preparatele gammaglobulinice normale, aprecierea eficienţei curativo-profilactice în focarele de boală este aproximativă şi dificilă. Dificultăţile de a întrevedea măsura în care prognosticul epizootologic şi vital ar putea fi influenţate de intervenţiile cu preparate gammaglobulinice, sînt legate de factori multipli: variaţia de patogenitate şi antigenitate a germenilor, etiologia frecvent polifactorială a îmbolnăvirilor (etiologie complexă, bacteriană şi virală, acţionînd sinergic cu factori de mediu), stări carenţiale şi de areactivitate a animalelor etc. Diagnosticul cauzal în aceste focare este de cele mai multe ori foarte dificil de stabilit, etiopatogenia în diareile, enteritele sau toxicozele nou-născuţilor nu este, pînă azi, suficient de precizată, iar combaterea cauzelor nu este uşor de realizat, dat fiind că substanţele terapeutice nu pot avea un spectru atît de larg de acţiune, nici cuprinde întreaga gamă de sensibilitate a unui număr atît de mare de agenţi patogeni acţionînd pe un organism cu o rezistenţă naturală atît de scăzută (Adameşteanu, 1968).

Ţinînd seama de spectrul relativ larg al anticorpilor antibacterieni şi antivirali, din preparatele gammaglobulinice normale, domeniile în care utilizarea lor este recomandabilă pot fi conturate astfel:

— în profilaxia şi terapia unor boli infecţioase ale nou-născuţilor şi animalelor tinere, în special în cele cu etiologie polifactorială şi polietiologică sau în care nu există biopreparate specifice;

— la animalele cu deficit imunoglobulinic, ca preparate de substituţie pentru reducerea predispoziţiei generale la infecţii şi ca preparate de suplimentare a metafilaxiei şi terapiei unor boli infecţioase deja manifeste;

— în afecţiuni ale parenchimului hepatic, nefrite şi proteinurie, în stări toxico-carenţiale, în pierderi masive de sînge şi în anemii prin radiaţii ionizante.

De menţionat că în funcţie de exprimările clinice dominante şi sindroamele diagnosticate, ca şi de factorii cauzali determinanţi sau favorizanţi, intuiţi sau stabiliţi prin examene paraclinice, intervenţiilor curativo-profilactice cu gammaglobuline trebuie să li se asocieze o medicaţie complexă corespunzătoare (antiinfecţioasă, simptomatică, stimulatoare etc.).

Recomandările concrete apărute în literatura de specialitate în legătură cu folosirea gammaglobulinelor la animale în anumite stări morbide, sînt foarte numeroase şi uneori destul de contradictorii, ele fiind sintetizate în diferite lucrări monografice (Le-

Scanned with OKEN Scanner

rieux, 1971; Kondi şi col., 1973; Marinescu, M., 1972 şi 1975; Popescu A., 1964 şi 1975; Iftimovici, R., 1970). Din aceste recomandări rezultă că dintre bolile importante şi care domină patologia actuală pot beneficia de aplicarea curativo-profilactică a gammaglobulinelor enteropatiile viţeilor, purceilor, mieilor şi mînjilor, pneumopatiile viţeilor, stările hipogammaglobulinemice şi sindroamele de adaptare (stări de stres).

În ceea ce priveşte calea de administrare, în medicina umană se dă prioritate celei intramusculare pentru evitarea riscului accidentelor anafilactice.

La animale, institutele producătoare recomandă administrarea intramusculară sau subcutană, pentru reducerea riscului fenomenelor secundare. Aceste căi au însă dezavantajul absorbţiei lente, nivelul maxim fiind atins în serul sanguin abia după 2—3 zile de la inoculare (Zureck şi col., 1963). Calea intraperitoneală, experimentată pe purcei nou-născuţi, este considerată favorabilă resorbţiei IgG şi IgM (Martinsson, 1970), unii contestîndu-i eficacitatea (Bahr şi col., 1970). Administrarea intravenoasă asigură cea mai rapidă difuzare a gammaglobulinelor prin torentul sanguin, fiind însă mai incomodă şi prezentînd pericolul reacţiilor de tip anafilactic, mai ales la viţei (Maermerski şi col., 1968), unde intoleranţa poate atinge valori de 19% (Fluckiger, 1969). S-a încercat şi administrarea aerogenă a gammaglobulinelor sub formă de aerosoli, suprimînd simptomele de parainfluenţă şi reducînd cu 10% morbiditatea faţă de administrarea subcutană (Haralambiev, 1972).

Calea peroorală, preconizată de Owen în 1964 şi folosită de Popescu (1964), Rejnek (1968) şi alţii, se impune în prezent în profilaxia enteritelor la animalele nou-născute, în primele 6—24 ore de la naştere, chiar dacă protecţia locală, conferită mucoasei intestinale, nu se reflectă în mod necesar în creşterea nivelului seric al gammaglobulinelor. În enteritele colibacilare în care multiplicarea şi acţiunea bacteriilor coliforme are loc în intestin, gammaglobulinele trebuie să ajungă cît mai repede posibil la acest nivel pentru a anihila germenii şi produsele lor toxice (Glawischnig şi col., 1970). Ca şi în cazul serurilor imune, administrarea orală a gammaglobulinelor are unele limite, legate de cenzura proteinoclazică (Chişiu, N., 1969).

Dozele de gammaglobuline variază după calităţile produsului, specia şi vîrsta animalelor, ca şi în funcţie de boală. La viţei, dozele preventive sînt de 20—25 mg/kg, iar cele curative de 50—200 mg/kg. La purcei, pentru prevenţie, în prima zi de viaţă, se administrează 200—300 mg, iar între 1—14 zile 300—500 mg — dozele crescînde pînă la 1 g la porcii adulţi, dublîndu-se dozele pentru scopuri terapeutice. La miei, dozele de gammaglobuline sînt de 0,5—1 g, iar la mînji de 1—2 g.

Fenomenele de intoleranţă consecutive intervenţiilor cu gammaglobuline la animale sînt rare, ele apărînd după administrările intravenoase mai ales la viţei, fiind atribuite fie şocului determinat de prezenţa antigenelor în sînge şi cuplării lor cu anticorpii corespondenţi gammaglobulinelor (Fluckiger, 1969), fie însuşirilor anticomplementare ale preparatelor (Dikker şi col., 1972). Folosirea gammaglobulinelor homoloage reduce mult riscul reacţiilor adverse.

XIII. 3. Imunoprofilaxia prin vaccinuri

Vaccinurile sînt produse biologice cu acţiune antigenică, obţinute din microorganisme sau toxine şi care inoculate unui organism îi conferă o imunitate activă faţă de agentul patogen din care provin.

Scanned with OKEN Scanner

După natura elementului activ şi modul de preparare, vaccinurile pot fi constituite din germeni vii şi virulenţi, din germeni atenuaţi, din germeni inactivaţi şi din toxine detoxifiate. Această împărţire în nici un caz nu trebuie să sugereze existenţa unei uniformităţi sau identităţi a vaccinurilor de un anumit tip, fiecare produs avînd o individualitate mai mult sau mai puţin caracteristică sub raportul metodologiei de preparare şi control şi, bineînţeles, al calităţilor imunogene intrinseci şi al recomandărilor de folosire.

XIII. 3.1. Vaccinuri constituite din germeni vii şi virulenţi

Aceste vaccinuri, aplicate pe scară destul de largă în trecut, au la ora actuală o utilizare restrînsă, tinzînd să fie înlocuite cu alte produse, ele prezentînd două dezavantaje esenţiale: a) pot produce accidente de vaccinare identice infecţiei spontane; b) creează artificial purtători de germeni şi deci focare de infecţie cu potenţial de difuzare, îngreunînd eradicarea bolilor.

În principiu, folosirea germenilor vii şi virulenţi îşi găseşte aplicabilitate numai în intervenţii de necesitate, în bolile în care nu se dispune de posibilităţi de imunizare lipsite de nocivitate şi fără implicaţii epizootologice.

În folosirea germenilor vii şi virulenţi ca vaccinuri au fost elaborate şi aplicate următoarele procedee:

a) vaccinarea simultană (serovaccinarea, serovirulizarea) a fost practicată în unele infecţii bacteriene septicemice sau cu virusuri politrope. Ea a constat în administrarea simultană, în puncte separate, a agentului patogen nemodificat (virulent) şi a unei anumite cantităţi de ser imun, serul asigurînd protecţia faţă de acţiunea invadantă a agentului vaccinal pînă în momentul în care organismul îşi elaborează anticorpii specifici proprii.

Serovaccinarea a fost folosită încă de la sfîrşitul secolului trecut în imunizarea antirujetică (metoda Lorentz) şi anticărbunoasă (metoda Sobernheim). Ea este introdusă în anul 1906 de D o r s e t în imunoprofilaxia pestei porcine sub denumirea de „serovirulizare" constituind timp de aproape 5 decenii metoda de bază în lupta împotriva acestei grave boli.

Dezavantajele legate de această metodă constau în dificultatea de a putea doza întotdeauna satisfăcătoar, mai ales în infecţiile bacteriene, raportul optim între germeni şi ser (antigen-anticorpi), existînd posibilitatea ca virulenţa microorganismului să depăşească imunitatea pasivă şi să genereze îmbolnăvirea, sau invers, virulenţa să fie neutralizată de ser şi să nu se mai instalaze o imunitate activă corespunzătoare ca intensitate şi durată. În infecţiile virale, agentul patogen folosit ca vaccin poate creea purtători şi eliminatori de virus pentru perioade lungi de timp, ducînd la crearea artificială a unor focare staţionare de infecţie;

b) vaccinarea pe căi neconvenabile tropismului agentului patogen s-a aplicat în bolile infecţioase produse de agenţi cu tropism limitat pentru anumite ţesături şi care, inoculaţi pe alte căi decît cele pe care se realizează boala naturală, determină o infecţie localizată benignă, soldată cu dobîndirea unei imunităţi solide. Pe acest principiu s-a bazat procedeul de imunizare antivariolică la ovine (variolizarea) folosit din timpuri străvechi şi constînd în inocularea intradermică a virusului (limfă variolică de la oi bolnave), reproducîndu-se o infecţie puternic imunizantă şi mult mai benignă comparativ cu boala naturală.

În 1852, W i l l e m s introduce în practică vaccinarea contra peripneumoniei contagioase a taurinelor, prin inocularea de triturat de organe cu leziuni la vîrful cozii (regiune săracă în ţesut conjunctiv). La animalele astfel inoculate, apare o reacţie locală,

Scanned with OKEN Scanner

de diferite intensităţi, care se poate solda cu necroza locului de inoculare, inducîndu-se o imunitate capabilă să asigure protecţie faţă de o infecţie spontană sau realizată pe căi naturale. Acelaşi principiu este aplicat de Beaudette şi Hudson (1932—1933) în laringotraheita infecţioasă aviară, prin administrarea virusului nemodificat sub formă de badijonări cloacale.

Dezavantajele procedeului constau în posibilitatea apariţiei unor accidente de vaccinare de gravitatea bolii naturale şi mai ales în determinarea de purtători şi crearea artificială a unor rezervoare de infecţie;

c) imunizarea prin „infecţii dirijate" şi-a găsit aplicarea în unele boli infecţioase cu evoluţie benignă, cu tendinţă de vindecare spontană. Astfel, în febra aftoasă, înaintea obţinerii unor vaccinuri inactivate eficiente, se practica uneori „aftizarea" (transmiterea experimentală a bolii la animalele expuse iminent contaminării) pentru grăbirea evoluţiei focarelor. În gastroenterita transmisibilă — prin administrarea de conţinut intestinal de la animale bolnave la scroafe gestante — s-a urmărit imunizarea lor şi transmiterea rezistenţei dobîndite purceilor. În ultimii ani, în coriza contagioasă aviară se practică infecţia artificială pe cale aerogenă, cu mucus de la păsări bolnave sau cu culturi de *H. gallinarum*, vizîndu-se imunizarea lor pentru evitarea îmbolnăvirilor în perioada ouatului cînd boala s-ar solda cu pierderi economice mari (Răducănescu şi col., 1979);

d) vaccinarea cu vaccinuri vii paraspecifice (heterotipice), se bazează pe folosirea în imunizare a unor germeni vii nemodificaţi, pentru a conferi protecţie faţă de alţi germeni înrudiţi antigenic cu cei vaccinali. Primul produs de acest fel, folosit de Jenner încă din anul 1789, a fost vaccinul contra variolei umane constituit din virusul variolei bovine şi care a stat la baza eradicării acestui grav flagel în cea mai mare parte a globului. În patologia animală, utilizarea tipului de virus variolic columbar la vaccinarea găinilor şi-a confirmat valoarea în imunoprofilaxia difterovariolei la galinacee şi la noi în ţară (Suhaci şi col., 1955; Gheorghiu şi col., 1956). Stabilirea existenţei unor înrudiri antigenice între virusul rujeolei umane, virusul pestei bovine şi virusul jigodiei (Melni şi col., 1966; Imagawa, 1968) au condus la introducerea în practică a folosirii virusului rujeolic în imunoprofilaxia jigodiei (Ackermann, 1970; Baker, 1970; Bitter, 1970). De asemenea, în pesta bovină animalele receptive se pot imuniza cu ajutorul vaccinului antijigodios sau antirujeolic (Le Lay şi col., 1965 Provost şi col., 1968), fără ca metoda să se extindă în practică. La virusul pestei porcine, Darbyshire (1960) evidenţiază existenţa unor relaţii antigenice cu virusul bolii mucoaselor, cu care s-a reuşit ulterior inducerea de răspuns imun antipestos la grăsuni (Dverby, 1973).

Ca vaccin heterolog cu extindere largă în ultimii 10 ani mai poate fi menţionat vaccinul împotriva bolii lui Marek reprezentat de un herpes virus de curcă, aplicat la noi în ţară de Pătraşcu şi col. (1974). În 1970, în S.U.A., Witter şi col. au izolat de la curcani sănătoşi un virus cultivabil pe culturi de celule aviare şi înrudit antigenic cu virusul bolii lui Marek, pretîndu-se la liofilizare (Pătraşcu şi col., 1972). Inoculat la puii de o zi, induce acestora o rezistenţă satisfăcătoare pentru a-i proteja de infecţia spontană cu virusul Marek.

Vaccinurile heterotipice, mai ales cele constituite din tulpini lipsite de agresivitate pentru gazda de origine, oferă mari avantaje imunoprofilaxiei bolilor din ai căror agenţi nu s-a reuşit obţinerea unor produse eficace. De asemenea, aceste virusuri folosite ca vaccinuri se diferenţiază relativ uşor de agenţii bolilor în a căror combatere se aplică.

Scanned with OKEN Scanner

Ca dezavantaje, imunitatea conferită de vaccinurile heterotrope este de obicei mai slabă comparativ cu cea indusă de tulpinile atenuate ale agentului cauzal. În cazul vaccinurilor din tulpini patogene pentru gazda de origine, animalele vaccinate prezintă un pericol potențial de difuzare a agenților patogeni. De exemplu, focarele de variolă bovină coincid adesea cu campaniile de vaccinare antivariolică umană, avînd ca origine virusul vaccinal din pustulele care se formează la persoanele vaccinate.

XIII. 3.2. Vaccinuri din germeni atenuați

Acestea au cea mai largă utilizare în imunoprofilaxia bolilor infecțioase. Ele sînt constituite din tulpini microbiene care și-au pierdut patogenitatea păstrîndu-și proprietățile imunogene și care, inoculate la organisme receptive, produc o infecție benignă sau asimptomatică, soldată cu conferirea unei imunități solide. Obținerea vaccinurilor atenuate se bazează pe variabilitatea microorganismelor.

O parte din aceste vaccinuri sînt constituite din tulpini izolate spontan ca tulpini atenuate sau apatogene. Majoritatea lor însă sînt obținute artificial, prin pasaje succesive și cultivare în medii ce nu corespund condițiilor proprii de multiplicare ale agentului patogen.

În cazul bacteriilor, atenuarea în vederea obținerii de tulpini vaccinale se realizează curent prin cultivarea la temperaturi disgenetice sau prin pasaje pe medii de cultură care conțin o serie de ingrediente ce frînează dezvoltarea normală a germenilor. Atenuarea bacteriilor poate fi corelată uneori cu unele modificări ale caracterelor morfologice și culturale ale germenului (apariția de variante S sau R). Alteori, tulpinile atenuate își modifică doar patogenitatea, păstrîndu-și mai mult sau mai puțin integre restul proprietăților și deci imunogenitatea.

Atenuarea virusurilor patogene se poate realiza fie prin pasaje în serie pe culturi de celule, fie prin adaptări la anumite țesuturi și schimbarea tropismului caracteristic în generarea infecției, fie prin adaptare pe specii de animale care în condiții naturale nu sînt receptive. Pentru atenuarea prin adaptarea virusurilor la anumite țesuturi sau gazde receptive, cele mai corespunzătoare s-au dovedit pasajele pe organisme tinere sau embrionare (ouă embrionate, șoareci sugari, iepuri sugari, culturi de celule embrionare). Vaccinurile obținute din tulpini atenuate prin embriopasaje sau prin adaptare la specii nereceptive natural, au fost denumite și vaccinuri avianizate, lapinizate etc. Atenuarea se realizează ca expresie și rezultat al adaptării pretențiilor biologice ale agentului patogen la noua gazdă. Prin acțiunea selectivă îndelungată și relativ stabilă a noilor condiții asupra mutațiilor ocazionale survenite la o tulpină în baza permanentei variabilități a populației de microorganisme, se ajunge la obținerea unei tulpini noi și relativ stabilă, caracterizată prin pierderea sau diminuarea patogenității inițiale și conservarea proprietăților antigenice. Progresele realizate în domeniul geneticii microbiene oferă posibilități noi de selecție dirijată în vederea obținerii unor tulpini vaccinale cu proprietățile dorite. Menținerea antigenității la tulpinile atenuate este absolut necesară pentru ca acestea să se preteze a fi folosite ca vaccinuri.

Bazele atenuării microorganismelor patogene în vederea folosirii lor ca vaccinuri au fost puse chiar de L. Pasteur, care a reușit modificarea virulenței la *Pasteurella* și *B. anthracis* prin cultivarea la temperaturi disgenetice și *E. insidiosa* prin treceri pe iepuri. Tot Pasteur a modificat virusul rabic „de stradă", prin pasaje

Scanned with OKEN Scanner

succesive pe cale intracerebrală la iepure, transformîndu-l în virus rabic fix, apatogen pe cale subcutană. Ulterior, au fost izolate sau obținute numeroase tulpini atenuate sau apatogene de microorganisme, folosite cu succes într-un mare număr de boli infecțioase la animale. Astfel, în imunoprofilaxia bolilor bacteriene acute, vaccinul anticărbunos constituit din tulpini sporogene, acapsulogene și edematogene (Stamatin și Stamatin, 1936; Sterne, 1937) este folosit în toate țările lumii, constituind principalul mijloc de luptă împotriva antraxului; vaccinul antirujetic din tulpini atenuate (Stamatin și Brașoveanu, 1948) este de asemenea folosit pe scară largă în numeroase țări. În bacteriozele cronice, vaccinul BCG (bacilul Kalmette-Guérin) folosit în imunizarea omului, a modificat profund epidemiologia tuberculozei umane. Vaccinul antibrucelic cu tulpina B.19 (Cotton și Buck, 1932) a limitat implicațiile economice antrenate de bruceloza bovină în zonele masiv contaminate.

Un domeniu mai nou în imunoprofilaxia infecțiilor bacteriene este reprezentat de vaccinurile din mutante auxotrofe, constituite din microorganisme a căror multiplicare este dependentă de prezența anumitor substraturi nutritive, absente în organismul animalelor receptive și de care nu au nevoie tulpinile obișnuite (prototrofe) ale aceluiași germen. Astfel de vaccinuri au fost verificate deocamdată experimental, reușindu-se obținerea unui vaccin antibrucelic (vaccinul Rev 1) dintr-o mutantă reversă a unei tulpini streptomicino-dependente (Alton și Elberg, 1967).

Un aspect particular, de mare actualitate și cu perspective în patologia neonatală a animalelor crescute în sistem intensiv îl constituie folosirea unor tulpini de bacterii selecționate și inofensive, pentru dirijarea microbismului intestinal al nou-născuților.

Vaccinurile din germeni vii atenuați își găsesc o largă utilizare în bolile virale, în unele din ele (pesta porcină, pseudopestă, turbare, boala lui Aujeszky etc.) imunoprofilaxia stînd la baza luptei antiepizootice, vaccinările fiind incluse ca intervenții planice în cadrul tehnologiilor sanitare veterinare.

Avantajele care caracterizează vaccinurile din germeni atenuați și care le impun altor tipuri de vaccinuri sînt următoarele:

— induc un răspuns imun prompt, cu instalarea rapidă a rezistenței postvaccinale. Această proprietate face posibilă folosirea lor și în intervenții de necesitate, prin vaccinarea animalelor sănătoase din efective contaminate, pentru întreruperea unor epizootii manifeste. La unele vaccinuri antivirale, rezistența la infecție poate preceda imunitatea postvaccinală, virusul vaccinal interferînd virusul agresiv;

— imunitatea conferită de vaccinurile din germeni atenuați este obișnuit solidă, de lungă durată și stabilă;

— tulpinile atenuate folosite ca vaccinuri în infecțiile bacteriene sînt tulpini care și-au pierdut obișnuit capacitatea de transmitere prin contact, calitate avantajoasă pentru asigurarea diagnosticului diferențial și supravegherii prin examene imunologice. La vaccinurile antivirale, unele tulpini atenuate se mai pot multiplica limitat în organismul animalelor vaccinate, creînd purtători și eliminatori de virus, cu posibilități de vaccinare a contacților. Acest aspect este foarte util pentru uniformizarea imunității în cazul vaccinărilor colective, animalele care n-au beneficiat de o doză corespunzătoare de vaccin imunizîndu-se prin contact cu virusul vaccinal eliminat de celelalte animale;

— vaccinurile din germeni atenuați corespund mai bine cerințelor creșterii intensive, pretîndu-se la aplicarea lor în vaccinări „de masă" sau colective prin intermediul apei de băut sau ca aerosoli

Scanned with OKEN Scanner

şi oferind deci posibilitatea de a exclude vaccinarea individuală.

Ca dezavantaje ale vaccinurilor vii pot fi menţionate următoarele:

— stabilitatea mai redusă decît a vaccinurilor inactivate, aspect suplinit în pestă de condiţionarea lor prin liofilizare;

— la unele vaccinuri sau tulpini vaccinale, prezenţa unei patogenităţi reziduale poate genera reacţii postvaccinale nedorite sau accidente de vaccinare, mai ales la animalele tarate, carenţate sau cu afecţiuni cronice, făcîndu-le aplicabile numai la animalele sănătoase;

— în infecţiile bacteriene cu evoluţie oculată (de ex. în bruceloze), vaccinurile din germeni atenuaţi sînt grevate de consecinţe nefavorabile asupra activităţii de depistare şi prin teste imunologice, deoarece anticorpii postvaccinali maschează infecţiile latente, întîrziind şi interferînd lupta antiepizootică (P o p, Al., 1970).

XIII. 3.3. Vaccinuri din microorganisme inactivate

Sînt constituite din germeni care, în urma tratării prin diferite procedee, şi-au pierdut capacitatea de multiplicare sau replicare antigenică în organismul individului vaccinat, avînd conservată structura antigenică.

Aprecierea microorganismelor din vaccinurile inactivate ca fiind moarte sau numai deposedate de capacitatea de multiplicare a generat numeroase divergenţe ştiinţifice, rămase pînă în prezent nerezolvate. Practica imunoprofilaxiei a demonstrat că inactivarea constituie un procedeu sigur de a face germenii din vaccinurile inactivate inofensivi în ceea ce priveşte inocuitatea lor.

Inactivarea microorganismelor se poate realiza prin mijloace chimice şi fizice. Dezideratul principal al inactivării constă pe de o parte în a asigura anihilarea capacităţii de înmulţire a germenilor, prin distrugerea acizilor nucleici sau a structurilor şi informaţiilor responsabile de multiplicare, iar pe de altă parte de a menţine cît mai intacte structurile antigenice prin conservarea proteinelor şi moleculelor de polizaharide responsabile de inducerea răspunsului imun.

Lipsa capacităţii de multiplicare sau replicare antigenică a germenului în organism face ca la vaccinurile inactivate răspunsul imun să se coreleze cu calitatea şi cantitatea antigenului încorporat în vaccin. Din această cauză, la prepararea vaccinurilor inactivate sînt necesare concentraţii mai mari de substanţe antigenice în vaccin, comparativ cu vaccinurile vii, utilizîndu-se tulpini microbiene selectate, cu capacitate imunogenă cît mai ridicată. Încorporarea de adjuvanţi care să intensifice stimulul antigenic asupra sistemului imunoformator măreşte capacitatea imunizantă a vaccinurilor inactivate.

Vaccinurile obţinute din suspensii de bacterii inactivate prin procedee fizice sau chimice poartă şi denumirea de „bacteriene", iar cele obţinute din culturi integrale de bacterii inactivate prin formol sînt denumite şi „anaculturi".

În funcţie de exigenţele de dezvoltare ale microorganismelor din care se prepară vaccinurile, masa antigenică necesară inactivării se obţine fie din culturi pe medii artificiale corespunzătoare, fie prin cultivarea pe ouă embrionate sau culturi de celule, fie din anumite organe de la animale infectate experimental.

Inactivarea prin procedee chimice este cel mai des folosită şi constă în tratarea masei antigenice cu diferite substanţe. Această tratare trebuie să fie foarte judicios condusă pentru a asigura atît eficacitatea vaccinului obţinut, cît şi lipsa de nocivitate (inocuitatea). Concentraţiile mici de substanţă inactivantă convin menţinerii structurii antigenice,

dar prezintă riscul supraviețuirii germenilor virulenți, în timp ce concentrațiile crescute de inactivant modifică peste limitele dorite imunogenitatea produsului obținut. Practica preparării vaccinurilor a permis standardizarea inactivării prin stabilirea unor procedee optime la fiecare vaccin, în funcție de agentul patogen, compoziția mediului, substanța inactivantă, durata și temperatura de inactivare etc.

Pentru inactivarea germenilor au fost folosite diferite substanțe antiseptice (formolul, fenolul, acetona, cloroformul, toluolul, mertiolatul etc.), coloranți (cristalul violet, albastru de metilen, albastru de toluidină) și unii compuși organici ca: betapropiolactona (Ubertini și col., 1957; Fayet și col., 1967) și derivații etilendiaminici (acetiletilenimina, etilenimina, hidroxilamina) (Rossi și col., 1967; Pay și col., 1971; Wittmann și col., 1972). O poziție deosebită între mijloacele chimice de inactivare o are formolul, substanța cea mai folosită pînă în prezent. Formolul s-a dovedit ca inactivant satisfăcător atît pentru virusuri, cît și pentru bacterii și secrețiile bacteriene toxice, păstrînd relativ bine și timp îndelungat structurile antigenice ale acestora.

Substanțele inactivante pot forma, cu constituenții din produsul de inactivat, complexe cu proprietăți antigenice noi, cu totul schimbate (Carpenter, 1956). Aceste complexe se pot forma cu proteinele și alte substanțe ce intră în compoziția vaccinului, ele determinînd efecte nedorite sau sensibilizări ale organismelor vaccinate, generînd reacții alergice după revaccinări (Heinig, 1974) sau reacții de tip autoimun.

Inactivarea prin procedee fizice. Căldura ca factor inactivant ajutător a fost și este larg folosită, la majoritatea vaccinurilor inactivate pe cale chimică, procesul de inactivare realizîndu-se la 37°C. Temperaturile ridicate însă, active prin acțiunea lor proprie, sînt ineficace în prepararea vaccinurilor, datorită distrugerii structurilor antigenice ale microorganismelor. Astfel, încălzirea la 56°C timp de o oră a suspensiilor bacteriene și virale duce la micșorarea evidentă sau distrugerea totală a proprietăților lor imunizante.

Inactivarea prin ultrasunete, raze ultraviolete și raze ionizante, a căror acțiune se poate doza corespunzător este posibilă în principiu, fără să se fi introdus în practica preparării vaccinurilor pentru animale. La om, s-au încercat vaccinuri antigripale inactivate prin raze ultraviolete și un vaccin antipertusic ultrasonat (Rhode și col., 1968).

Vaccinurile iradiate prin raze ionizante (radiovaccinuri) oferă unele perspective, demonstrate de Traub și col. încă din anul 1971 la virusul rabic, cu avantaje în ceea ce privește toleranța, imunogenitatea și conservabilitatea. Procedeul se încearcă la microorganismele la care metodele curente de inactivare nu conservă antigenitatea, razele gamma dînd rezultate superioare formolului în inactivarea enterobacteriaceelor (Richter, 1973).

Avantajele vaccinurilor inactivate constau în primul rînd în faptul că avînd o inocuitate ridicată, pot fi aplicate pe animale debile, cu boli intercurente sau foarte sensibile și la care vaccinurile vii sînt contraindicate. De asemenea, ele pot fi obținute și din agenții unor boli la care nu s-a reușit atenuarea convenabilă și nu se întrezăresc alte perspective imunoprofilactice (de ex. febra aftoasă).

Dezavantajele vaccinurilor inactivate constau în apariția mai tardivă a răspunsului imun, imunitatea conferită fiind mai puțin stabilă și de mai scurtă durată, comparativ cu cea obținută cu vaccinurile vii. Pentru animalele tinere, doza vaccinală trebuie să conțină un număr mai mare de doze imunizante decît cea pentru animalele adulte, pentru a obține același răspuns imun (Munțiu și col., 1975). Imunitatea se consolidează obișnuit după

Scanned with OKEN Scanner

o vaccinare de rapel făcută la 1—3 săptămîni după prima vaccinare.

Pentru a reduce din efectele nedorite ale vaccinurilor inactivate (alergizante sau chiar toxice), legate de necesitatea folosirii unei cantităţi mari de antigen, se tinde spre obţinerea şi prepararea lor din antigene purificate prin diferite procedee (adsorbţie, filtrare, centrifugare, extracţie şi separare electroforetică) care să conţină sub formă concentrată componentele ce generează imunitatea.

În cadrul vaccinurilor inactivate, o categorie aparte de imunopreparate este constituită din vaccinurile „de grajd" sau „de focar", denumite şi autovaccinuri. Ele sînt preparate din tulpini de microorganisme izolate din material patologic provenit de la animale din anumite efective, fiind folosite numai în aceste efective.

La baza folosirii acestui tip de vaccinuri stă premisa că tulpinile de microorganisme locale, responsabile de anumite episoade, prin particularităţile lor antigenice şi de patogenitate induc o imunitate mai corespunzătoare decît tulpinile de colecţie. Ele sînt constituite de regulă fie din culturi bacteriene, fie din triturate de organe ca masă vi-rală, inactivate prin formol şi eventual adjuvantate. Astfel de vaccinuri sînt folosite la vaccinarea animalelor gestante, în focarele de colibaciloză la nou-născuţi pentru transmiterea protecţiei prin colostru (Schoenaers şi col., 1958), în gurmă (Mitroi, 1958), actinobaciloză (Răducănescu, 1973) etc. De asemenea, un astfel de vaccin, constituit din triturat de pulmon cu leziuni, suspendat în culturi de *Pasteurella* (tulpini izolate din focar), inactivat şi adjuvantat cu hidroxid de aluminiu, a fost folosit cu bune rezultate la tineretul taurin introdus în îngrăşătorii semiintensive, pentru prevenirea pneumopatiilor (Popovici, I. şi Popoviciu, A., 1973). Autovaccinurile sînt utile şi oferă avantaje în rezolvarea de moment a unor focare, dar sînt limitate sub raportul perspectivei permanentizării folosirii lor eficiente, datorită reînnoirii într-un ritm imprevizibil a tulpinilor, mai ales la speciile bacteriene cu pluralitate antigenică (de ex. *E. coli*). Ele sînt supuse obişnuit controlului efectuat de către Laboratorul de Stat pentru controlul produselor biologice, iar prepararea şi folosirea lor trebuie să fie aprobată de Direcţia Sanitară Veterinară.

XIII. 3.4. Vaccinuri din toxine detoxifiate (anatoxine)

Detoxifierea toxinelor difterice şi tetanice prin compuşi iodaţi şi folosirea lor la imunizarea cailor producători de ser a fost realizată de Behring în anul 1890. G. Ramon (1925) are marele merit de a fi pus bazele transformării toxinelor microbiene în vaccinuri. Cu ajutorul formolului şi căldurii, din filtratele de culturi bacteriene conţinînd exotoxine, Ramon obţine produse atoxice şi cu o ridicată valoare imunizantă şi folosite pe scară largă ca vaccinuri, denumite anatoxine sau toxoizi. După acelaşi principiu au putut fi obţinute anatoxine şi din diferite toxalbumine animale şi vegetale (de ex. din toxalbumina ricinică — Popoviciu, 1951).

Pentru obţinerea anatoxinelor pot fi utilizate culturile de bacterii toxigene (*C. tetani*, *C. botulinum*, *C. diphteriae*, *Staphilococcus* etc.) sau toxinele purificate prin diferite procedee (de ex. precipitare cu sulfat de amoniu), tratate cu formol, la temperatura termostatului (37°C). Produsele obţinute se pot folosi la imunizare ca atare, sau adjuvantate cu hidroxid de aluminiu (cu acţiune adsorbantă) sau fosfat de aluminiu (precipitant), substanţele adjuvante mărind mult efectul imunizant (Rhode, 1968).

Anatoxinele se folosesc ca vaccinuri în bolile în care acţiunea agenţilor patogeni este datorită toxinelor (tetanos, botulism, difterie umană) şi mai puţin în cele în care mecanismul patogenetic are la bază acţiunea mixtă a germenilor, prin toxine şi virulenţă (cărbune emfizematos, infecţii cu *C. perfringens* etc.) şi în care sînt preferate anaculturile.

XIII. 3.5. Substanţe adjuvante şi imunostimulente nespecifice

Substanţele adjuvante şi imunostimulente sînt produse care inoculate în organism acţionează asupra sistemului imunoformator şi a factorilor de apărare nespecifică mărind rezistenţa organismului.

În general, sînt denumite substanţe adjuvante sau adjuvanţi, produsele care se încorporează în vaccinuri şi care, fără a avea o legătură chimică cu antigenul vaccinal, îi ridică valoarea imunizantă.

Cele mai folosite substanţe adjuvante în tehnica preparării vaccinurilor sînt: gelul de hidroxid de aluminiu, uleiurile minerale şi vegetale, saponina, geloza, clorura de calciu şi lanolina.

Hidroxidul de aluminiu ($Al(OH)_3$) se obţine prin diferite tehnici, la noi în ţară folosindu-se tehnica elaborată de V. Georgescu (1958), prepararea avînd la bază precipitarea alaunului şi eliminarea ulterioară prin spălalare a anionului So_4. Este o soluţie coloidală de culoare albă-lăptoasă, care lăsată în repaus formează sediment. Produsul are remarcabile proprietăţi adjuvante, mărind mult imunogenitatea suspensiilor virale şi bacteriene inactivate. De asemenea, are însemnate însuşiri adsorbante faţă de virusuri toxine bacteriene, proteine serice, fermenţi etc.

La prepararea produselor inactivate, hidroxidul poate fi amestecat cu antigenul vaccinal după inactivarea acestuia sau înainte de inactivare. În ultimul caz, amestecul materialului virulent cu hidroxidul se lasă pentru adsorbţie un anumit timp, la o temperatură corespunzătoare (30—37°C), după care se adaugă substanţa inactivantă — de obicei formolul. Vaccinurile astfel adjuvantate, denumite şi vaccinuri adsorbite pe hidroxid de aluminiu, au o largă utilizare, demonstrîndu-şi eficacitatea în febra aftoasă, pesta porcină, pseudopesta aviară etc. Ca adjuvanţi cu proprietăţi asemănătoare hidroxidului se mai utilizează fosfatul de aluminiu şi alaunul de potasiu.

Saponina este un glucozid cu proprietăţi hemolitice şi necrozante. Adăugată în doze convenabile la unele vaccinuri, le măreşte considerabil imunogenitatea. Se utilizează ca adjuvant la vaccinurile anticărbunoase, antiaftoase, antipasteurelice etc.

Geloza este încorporată ca adjuvant la unele vaccinuri bacteriene vii (anticărbunos, antirujetic).

Adjuvanţii uleioşi, reprezentaţi de uleiurile vegetale şi minerale, au o utilizare din ce în ce mai largă în mărirea activităţii vaccinurilor, oferind avantaje atît în ceea ce priveşte inocuitatea produselor, cît şi pentru evitarea unor efecte nedorite legate de creşterea capacităţii alergizante a masei antigenice (Jacotot, 1962).

Efecte superioare în adjuvantarea vaccinurilor au dovedit-o amestecurile de ulei mineral (de parafină), arlacel (monooleat) şi extracte de micobacterii (*M. butyricum*).

Substanţele adjuvante folosite în prepararea vaccinurilor acţionează prin aşa-numitul efect de „depozit", constînd în întîrzierea resorbţiei rapide a antigenului la locul de administrare, mărind prin aceasta perioada de stimulare imunogenică. Altele determină uşoare reacţii inflamatorii la locul de administrare cu aflux de celule imunocompetente (Werner, 1978).

Scanned with OKEN Scanner

În afară de adjuvanţii încorporaţi în vaccinuri pentru mărirea potenţialului lor imunogen, au mai fost încercate o serie de substanţe imunostimulente, capabile să favorizeze reacţiile imunologice care intervin în apărarea naturală a animalelor. Aceste reacţii multiple şi diverse, dealtfel, pot acţiona nespecific într-un stadiu precoce al infecţiei (interferon, fagocitoză) sau intervin tardiv şi specific (limfocite B şi anticorpi, limfocite T citolitice etc.). Substanţele capabile să stimuleze fagocitoza, să mărească producţia *in situ* de interferon şi să determine o creştere sau acceleraţie a producţiei de anticorpi pot avea un efect aditiv asupra reacţiilor naturale de apărare mărind rezistenţa animalelor la infecţiile virale, avînd o acţiune mai precoce şi mai puţin specifică decît cea a vaccinurilor (W e r n e r, 1978).

Producţia de interferon poate fi indusă în organism de extracte de ciuperci, bacterii, plante, prin substanţe stimulatoare ca fitohemaglutinina şi unii acizi nucleici, precum şi de diferite produse sintetice (V î l c e k, 1969; B o d o, 1971; M a y r, 1974). De asemenea, interferonul poate fi obţinut şi *in vitro* pe culturi de celule, cu ajutorul unor virusuri inactivate ca element stimulator, fără a avea relaţii antigenice cu inductorul (M a y r, 1974).

Substanţele imunostimulente şi-au găsit deocamdată un cîmp mai larg de verificare şi utilizare în imunoterapia cancerului uman şi în unele infecţii virale experimentale (B a u e r, 1977; L a g r a n g e, 1977) fiind însă puţin studiate în medicina veterinară.

Ca produse imunostimulente pot fi menţionate lipopolizaharidele (endotoxinele din bacteriile Gram negative, micobacterii, *Corynebacterium parvum*, polizaharidele extrase din levuri şi ciuperci) sau diferite produse obţinute prin sinteză (toxine Coley, Mycobacter, cordfactor, MER, EBP, lipexal, propidon, zymosan, statolon, lentinan, tiloron, levamisol etc.) unele existente ca produse oficinale în arsenalul terapeutic uman şi veterinar (C h e d i d, 1976; C h a o y, 1976; W e r n e r şi col., 1977). Tot ca produse cu utilizare largă destinate terapiei de stimulare pot fi menţionate extractele bacteriene de tipul omnadinului-polidinului. Mecanismul lor de acţiune este deosebit de complex, declanşînd în organism reacţii de adaptare generală, caracterizate prin intensificarea arderilor, activarea circulaţiei şi a sistemelor enzimatice etc., ca şi reacţii de apărare imunologică prin activarea fagocitozei, creşterea titrului properdinic şi a sintezei imunoglobulinelor (M a r i n e s c u, 1975).

Foarte probabil că viitorul va oferi imunostimulente pentru patologia animală cu perspective de aplicare în unele infecţii cu etiologie obscură sau multiplă (de ex. pneumopatiile tineretului) în care imunoprofilaxia prin seruri şi vaccinuri s-a dovedit de o eficienţă destul de limitată în producţie. Pe de altă parte, dezvoltarea cunoştinţelor privind stările subclinice de deficit imunologic care măresc sensibilitatea animalelor şi gravitatea evoluţiei în unele boli oferă posibilitatea de folosire a imunostimulentelor ca substanţe „imunorestauratoare" (W e r n e r, 1978). În sfîrşit, obţinerea de imunostimulente utilizabile ca adjuvanţi cu calităţi superioare constituie una din direcţiile de îmbunătăţire în viitor a calităţii biopreparatelor aplicate în imunoprofilaxie.

XIII. 3.6. Prepararea şi controlul vaccinurilor

Un vaccin pentru a putea fi preparat şi utilizat în practică trebuie să îndeplinească următoarele condiţii: să poată fi obţinut în cantităţi industriale în limitele unui cost justificat; să aibă o valoare convenabilă pe care să

Scanned with OKEN Scanner

şi-o conserve în condiţii de păstrare realizabile; să fie lipsit de nocivitate şi să fie imunogen.

Producţia de vaccinuri se realizează în unităţi specializate, denumite biofabrici, institute de produse biologice sau de biopreparate.

Caracteristica esenţială a institutelor de biopreparate constă în faptul că la sistemul global de producţie participă 3 subsisteme biologice de o mare complexitate şi diversitate, susceptibile la mari variaţii ce pot condiţiona produsul finit. Aceste subsisteme sînt reprezentate de microorganismele din care se obţin vaccinurile, substratul de cultivare a acestor microorganisme şi animalele de experienţă. Cunoaşterea cît mai amănunţită şi permanentă a caracteristicilor, legităţilor şi relaţiilor acestor subsisteme este principala premisă pentru respectarea protocoalelor de preparare şi asigurare a unei producţii stabile, planificabile, cu prevederea celor necesare obţinerii fiecărui vaccin sub raportul cantităţii, preţului de cost şi calităţilor biologice pe care trebuie să le întrunească.

Parametrii valorii de utilizare ce trebuie asiguraţi unui vaccin sînt legaţi de proprietăţile intrinseci ale produsului (eficacitate, indicaţii, conservare etc.) şi de nevoile specifice ale producţiei animale, trebuind să se situeze la nivelul tehnicii mondiale. Pe de altă parte, producţia industrială de biopreparate impune o permanentă analiză şi direcţionare pentru optimizarea tehnologiilor de preparare, reducerea costurilor şi obţinerea unor produse şi forme de administrare adecvate cerinţelor producţiei şi satisfacerii dezideratelor sanitare veterinare pentru care sînt preparate şi aplicate.

În producţia industrială de vaccinuri, subsistemul cel mai important, care s-a dezvoltat vertigions în ultimul deceniu, determinant în modernizarea şi diversificarea producţiei şi oferind cele mai mari perspective pentru viitor, îl constituie substratul de multiplicare a antigenelor. În cazul antigenelor bacteriene, multiplicarea lor pe mediile artificiale de cultură a făcut posibilă elaborarea unor tehnologii de preparare foarte uşor de supravegheat şi dirijat. Rămîne deschisă problema îmbunătăţirii cultivării bacteriilor pe medii sintetice cît mai strîns corelate cu cerinţele lor metabolice, atît pentru obţinerea unor concentraţii cît mai mari de antigen, cît şi pentru reducerea substanţelor de balast din mediile de cultură în produsul finit.

Antigenele virale nu pot fi multiplicate decît pe celule vii. În funcţie de proprietăţile tulpinilor vaccinale, obţinerea lor industrială se realizează prin multiplicare pe animale receptive, pe ouă embrionate sau pe culturi de celule. Primele două posibilităţi sînt mai limitate sub raportul producţiei cantitative, datorită unor impedimente obiective legate de procurarea materiei prime şi calităţile ei foarte variabile.

Astfel, multiplicarea pe animale are ca dezavantaje: cost ridicat, volum mare de muncă şi manipulări uneori periculoase, variaţii mari ale reactivităţii animalelor şi care nu se pot evita complet prin folosirea de loturi cu uniformitate genetică sau prin standardizarea condiţiilor de lucru, prezenţa unor infecţii latente ce pot compromite sterilitatea şi inocuitatea vaccinului, evitabile prin folosirea de animale gnotobiotice (germ-free) sau libere de germeni patogeni (SPF). Totuşi există şi în prezent vaccinuri preparate pe animale donatoare (vaccinurile antipestoase porcine inactivate, preparate pe porc; vaccinul antipestos porcin lapinizat, multiplicat pe iepure; vaccinul antirabic preparat pe oaie etc.).

Ouăle embrionate reprezintă pentru numeroase virusuri modalitatea principală de multiplicare în vederea obţinerii antigenelor vaccinale. Ele sînt ieftine şi uşor de obţinut, avînd o sensibilitate uniformă pentru anumite virusuri (de ex. mixovirusuri), dînd rezultate superioare culturilor celulare. Vaccinurile vii preparate pe ouă convenţionale, chiar cînd acestea provin din unităţi

Scanned with OKEN Scanner

indemne şi sînt dezinfectate la exterior, pot conţine unele microorganisme latente pe care să le transfere prin vaccinare, fapt ce poate fi complet evitat prin utilizarea ouălor SPF. De asemenea, prepararea vaccinurilor de ovocultură este laborioasă.

Culturile de celule sînt gazde ideale pentru cele mai multe virusuri. Datorită posibilităţilor de obţinere industrială şi avantajelor pe care le oferă, ele constituie în producţia modernă de vaccinuri principalul substrat de multiplicare, oferind în continuare mari perspective de extindere.

După modul în care se obţin, culturile de celule pot fi culturi primare, linii celulare diploide şi linii celulare permanente.

Culturile primare se obţin prin cultivarea celulelor dezintegrate prin tripsinizare din ţesuturi embrionare sau de la animalele tinere. Conform recomandărilor O.M.S., culturile primare folosite la prepararea vaccinurilor trebuie să provină din ţesuturi normale, să nu difere de cariotipul normal, să nu prezinte anomalii tumorale ce ar putea induce efecte oncogene şi să fie libere de poluanţi (contaminanţi) identificabili. Culturile din ţesuturi embrionare sînt de preferat şi pentru că limitează posibilităţile de contaminare a substratului.

Dezavantajele culturilor primare constau în faptul că impun un număr mare de donatori (viţei, purcei) şi prezintă pericolul continuu de contaminare cu virusuri latente de la aceştia.

Liniile celulare diploide sînt populaţii de celule capabile să se reproducă în subculturi, păstrînd cariotipul ţesutului de origine la cel puţin 85% din celule. Viabilitatea acestor linii este limitată la 30—60 subculturi. Astfel de linii au fost obţinute din organe de la majoritatea speciilor de animale domestice şi de laborator.

Liniile celulare permanente pot fi pasate nelimitat şi multiplicate *in vitro*, păstrîndu-şi cariotipul celulelor primare de origine. Se consideră linie celulară permanentă o linie de celule care continuă să se multiplice după cel puţin 70 pasaje (M a y r şi col., 1974). În prezent, sînt cel puţin 300 de linii celulare permanente folosite în producţia industrială de multiplicare antigenică, cu avantaje hotărîtoare în producţia de biopreparate (H o r s c h, 1977). Ele au posibilitatea de a se multiplica şi în suspensie, permiţînd automatizarea tehnologiilor de producţie a antigenelor virale. De asemenea, ele pot fi conservate în azot lichid. Linia permanentă cea mai des folosită este linia BHK-21.

Celulele de cultură se dezvoltă fie în strat continuu (monostrat) pe pereţii recipientului, fie în suspensie, în toată masa mediului. Pentru obţinerea monostratului se pot face culturi staţionare (celulele de cultură suspendate în mediu se depun la termostat) sau culturi rulante (baloanele cu suspensie celulară sînt rotate uniform, la termostat, monostratul dezvoltîndu-se pe tot peretele recipientului). Pentru a mări randamentul producţiei de celule, pot fi introduse în culturi bile de material plastic, monostratul dezvoltîndu-se şi pe suprafaţa acestora.

Culturile de celule în suspensie (submersie) sînt cele mai avantajoase, permiţînd obţinerea unor cantităţi mari de substrat pentru cultivarea virusurilor şi deci randament superior. Procedeul se pretează numai pentru liniile celulare permanente. El permite automatizarea tehnologiei de fabricaţie prin asigurarea automată a aportului de mediu şi oxigen, a reglării temperaturii, pH-ului etc., ca şi utilizarea unor circuite „închise" în transferul culturilor în fermentoare de capacităţi succesive, pînă la un volum de mai multe mii de litri. De asemenea, celulele oferă perspective de a putea fi menţinute în faza logaritmică de multiplicare prin adaos automat continuu de mediu şi aport de oxigen, obţinîndu-se o densitate de 10^6—10^7 celule/ml suspensie.

Pe plan mondial, tehnica culturilor de celule în suspensie este încă la începuturile ei, dovedindu-şi avantajele deosebite şi marea eficienţă în condi-

Scanned with OKEN Scanner

ţiile producţiei de vaccinuri antiaftoase.

Condiţiile de folosire a substraturilor de multiplicare a antigenelor, ca şi prelucrarea acestora pentru transformarea în vaccinuri sînt stabilite foarte exact în protocoalele de preparare a fiecărui produs. Fiecare şarjă de vaccin este înregistrată şi prezentată controlului de calitate.

Vaccinurile care au satisfăcut normele de control sînt livrate în ambalaje corespunzătoare (fiole, flacoane), cu etichete lipite sau ştanţate, pe care este înscrisă denumirea produsului, seria, valabilitatea, ambalajele fiind însoţite de instrucţiuni detaliate de folosire.

Controlul vaccinurilor. Vaccinurile, ca produse medicale de intervenţie antiepizootică, prin modul lor de preparare, pot conţine unii agenţi infecţioşi. De asemenea, ele au o largă utilizare profilactică, la animalele sănătoase, uneori venind în contact cu întregul efectiv al unei specii (vaccinări generale şi obligatorii). Pe de altă parte, calitatea lor de bază — valoarea imunizantă — nu poate fi cunoscută real în cursul utilizării. Toate aceste aspecte antrenează implicaţii şi responsabilităţi deosebite legate de producţia şi circulaţia acestor produse, impunînd şi justificînd necesitatea supunerii lor unui control de stat.

În toate ţările, supravegherea preparării, circulaţiei şi utilizării vaccinurilor este de competenţa Serviciului veterinar de stat, controlul şi girul calităţii lor asigurîndu-se printr-un laborator cu profil de control. Direcţia sanitară veterinară din Ministerul Agriculturii şi Industriei Alimentare îşi exercită controlul de stat asupra calităţii vaccinurilor prin Laboratorul Central de control al produselor biologice şi medicamentoase de uz veterinar (art. 29 şi 30 din „Norme şi măsuri sanitare veterinare elaborate în baza Legii Sanitare Veterinare nr. 60 din 29.X.1974).

În principiu, obiectivele Laboratorului de Control sînt de a asigura biofabricilor tulpini microbiene corespunzătoare, necesare producerii vaccinurilor, de a controla materiile prime şi diferite trepte din fluxul tehnologic al preparării produselor, de a efectua controlul de stat al calităţii produselor, precum şi de a verifica difuzarea, conservarea şi folosirea corespunzătoare a biopreparatelor.

Cerinţa de bază care trebuie să rezulte din controlul vaccinurilor este de a se garanta sterilitatea, lipsa de nocivitate şi eficacitatea acestor produse.

Controlul de stat se execută după protocoale legiferate, adaptate particularităţilor fiecărui vaccin în parte, avînd stipulate şi condiţiile de recoltare a probelor de la fiecare şarjă de produs. Eşantioanele destinate controlului trebuie să fie proporţionale cu mărimea şarjei şi cu necesităţile metodologiei de control pentru a asigura legităţile statisticii biologice în interpretarea şi exprimarea rezultatelor (S p i c h e r si col., 1975).

La vaccinurile inactivate, controlul trebuie făcut complex, la fiecare şarjă, posibilităţile de variaţie a calităţii fiind în general mai mari. La vaccinurile vii, în funcţie de cunoaşterea stabilităţii tulpinii vaccinale controlul şarjelor de producţie poate fi mult simplificat. Este foarte important însă ca la vaccinurile vii să se constituie o „matcă" de însămînţare dintr-un pasaj definit, la care să fie verificată imunogenitatea, urmînd ca această „matcă" să constituie materialul de plecare pentru şarjele de producţie pe o perioadă mai lungă de timp. Pentru aprecierea identităţii şi stabilităţii tulpinilor vaccinale este recomandată stabilirea unei proprietăţi „marker", cum ar fi: virulenţa, imunogenitatea, comportarea culturilor la anumite temperaturi, comportarea pe culturi de celule, particularităţi antigenice, dependenţa multiplicării de un anumit substrat (auxotrof) sau de un anumit antibiotic (antibiodependenţă) etc.

Controlul sterilităţii vaccinurilor constă în însămînţarea din eşantioanele

Scanned with OKEN Scanner

ţiile producţiei de vaccinuri antiaftoase.

Condiţiile de folosire a substraturilor de multiplicare a antigenelor, ca şi prelucrarea acestora pentru transformarea în vaccinuri sînt stabilite foarte exact în protocoalele de preparare a fiecărui produs. Fiecare şarjă de vaccin este înregistrată şi prezentată controlului de calitate.

Vaccinurile care au satisfăcut normele de control sînt livrate în ambalaje corespunzătoare (fiole, flacoane), cu etichete lipite sau ştanţate, pe care este înscrisă denumirea produsului, seria, valabilitatea, ambalajele fiind însoţite de instrucţiuni detaliate de folosire.

Controlul vaccinurilor. Vaccinurile, ca produse medicale de intervenţie antiepizootică, prin modul lor de preparare, pot conţine unii agenţi infecţioşi. De asemenea, ele au o largă utilizare profilactică, la animalele sănătoase, uneori venind în contact cu întregul efectiv al unei specii (vaccinări generale şi obligatorii). Pe de altă parte, calitatea lor de bază — valoarea imunizantă — nu poate fi cunoscută real în cursul utilizării. Toate aceste aspecte antrenează implicaţii şi responsabilităţi deosebite legate de producţia şi circulaţia acestor produse, impunînd şi justificînd necesitatea supunerii lor unui control de stat.

În toate ţările, supravegherea preparării, circulaţiei şi utilizării vaccinurilor este de competenţa Serviciului veterinar de stat, controlul şi girul calităţii lor asigurîndu-se printr-un laborator cu profil de control. Direcţia sanitară veterinară din Ministerul Agriculturii şi Industriei Alimentare îşi exercită controlul de stat asupra calităţii vaccinurilor prin Laboratorul Central de control al produselor biologice şi medicamentoase de uz veterinar (art. 29 şi 30 din „Norme şi măsuri sanitare veterinare elaborate în baza Legii Sanitare Veterinare nr. 60 din 29.X.1974).

În principiu, obiectivele Laboratorului de Control sînt de a asigura biofabricilor tulpini microbiene corespunzătoare, necesare producerii vaccinurilor, de a controla materiile prime şi diferite trepte din fluxul tehnologic al preparării produselor, de a efectua controlul de stat al calităţii produselor, precum şi de a verifica difuzarea, conservarea şi folosirea corespunzătoare a biopreparatelor.

Cerinţa de bază care trebuie să rezulte din controlul vaccinurilor este de a se garanta sterilitatea, lipsa de nocivitate şi eficacitatea acestor produse.

Controlul de stat se execută după protocoale legiferate, adaptate particularităţilor fiecărui vaccin în parte, avînd stipulate şi condiţiile de recoltare a probelor de la fiecare şarjă de produs. Eşantioanele destinate controlului trebuie să fie proporţionale cu mărimea şarjei şi cu necesităţile metodologiei de control pentru a asigura legităţile statisticii biologice în interpretarea şi exprimarea rezultatelor (S p i c h e r si col., 1975).

La vaccinurile inactivate, controlul trebuie făcut complex, la fiecare şarjă, posibilităţile de variaţie a calităţii fiind în general mai mari. La vaccinurile vii, în funcţie de cunoaşterea stabilităţii tulpinii vaccinale controlul şarjelor de producţie poate fi mult simplificat. Este foarte important însă ca la vaccinurile vii să se constituie o „matcă" de însămînţare dintr-un pasaj definit, la care să fie verificată imunogenitatea, urmînd ca această „matcă" să constituie materialul de plecare pentru şarjele de producţie pe o perioadă mai lungă de timp. Pentru aprecierea identităţii şi stabilităţii tulpinilor vaccinale este recomandată stabilirea unei proprietăţi „marker", cum ar fi: virulenţa, imunogenitatea, comportarea culturilor la anumite temperaturi, comportarea pe culturi de celule, particularităţi antigenice, dependenţa multiplicării de un anumit substrat (auxotrof) sau de un anumit antibiotic (antibiodependenţă) etc.

Controlul sterilităţii vaccinurilor constă în însămînţarea din eşantioanele

Scanned with OKEN Scanner

recoltate, pe medii de cultură obişnuite pentru bacteriile aerobe, anaerobe şi fungi. Pentru micoplasme, chlamydii şi virusuri, controlul sterilităţii se practică numai în cazul vaccinurilor vii multiplicate pe un substrat susceptibil de a fi contaminat cu aceste microorganisme.

Sterilitatea trebuie să fie o condiţie obligatorie pentru toate vaccinurile destinate administrărilor parenterale. În cazul vaccinurilor utilizate prin administări orale, conjunctivale sau aerogene, nu se impune o sterilitate obligatorie, putînd fi acceptată o contaminare microbiană limitată cu germeni nepatogeni. După Mabel şi col. (1975), la produsul final ar putea fi admisă o încărcătură de 1000 bacterii/g şi 100 fungi/g, excluzîndu-se vaccinurile contaminate cu enterobacteriaceae, *Ps. aeruginosa* şi stafilococi patogeni.

Testarea inocuităţii (lipsei de nocivitate) se bazează pe inoculări din eşantioanele de control la 3—5 animale din specia pentru care este destinat produsul şi la animale de laborator (şoareci albi). În cazul vaccinurilor virale din tulpini embrioletale sau cu efect citopatic pot fi folosite ca sisteme de determinare a nocivităţii ouăle embrionate şi culturile de celule. Pentru a mări siguranţa lipsei de nocivitate, pot fi administrate doze vaccinale duble la animalele pe care se face verificarea.

În cazul vaccinurilor inactivate controlul trebuie să excludă supravieţuirea microorganismului virulent din care acestea s-au preparat, impunîndu-se verificarea inocuităţii pe animale receptive.

Se consideră lipsite de nocivitate probele care nu determină la animalele inoculate modificări ale stării generale sau reacţii inflamatorii la locul de inoculare. Se exclud din interpretare reacţiile animalelor inoculate ce constituie modificări tolerabile şi sînt considerate chiar modificări dorite în urma vaccinării. Aspectul şi incidenţa acestui tip de reacţii sînt cunoscute şi consemnate în protocoalele de control şi instrucţiunile de folosire a vaccinurilor, incluzînd edemele locale sau nodulii după aplicarea vaccinurilor adsorbite sau adjuvantate şi hipertermia moderată consecutivă vaccinării cu unele vaccinuri vii.

Controlul eficacităţii (imunogenităţii) se realizează obişnuit prin vaccinarea unui lot de animale care după instalarea imunităţii să fie supus, concomitent cu un lot nevaccinat, la o infecţie experimentală de control cu o tulpină virulentă. Eficienţa acestui model experimental este condiţionată de utilizarea unor animale care să răspundă fidel la stimulul antigenic al vaccinului, cele nevaccinate reproducînd constant o infecţie mortală sau simptome specifice, după inocularea unor doze stabilite de germeni. Astfel de modele se folosesc la controlul vaccinurilor pentru bolile produse de germeni cu virulenţă ridicată (febra aftoasă, pesta porcină, pseudopestă, antrax, rujet, boala lui Aujeszky, jigodie etc.).

Cînd se poate stabili o corelaţie strînsă între rezultatele titrărilor imunogenităţii pe animale din specia pentru care produsul este destinat şi cele obţinute pe animale de laborator, protocoalele de control pot prevedea folosirea acestora la testare (de ex.: testarea vaccinului antirujetic pe şoareci, a celor contra anaerobiozelor şi cărbunelui emfizematos pe cobai etc.).

În cazul unor boli condiţionate, ai căror agenţi determinanţi au o virulenţă scăzută şi cu care reproducerea experimentală este incertă, nu s-a reuşit elaborarea unor modele experimentale satisfăcătoare controlului eficacităţii vaccinurilor. În acest sens, pot fi menţionate vaccinurile anticolibacilare, antipasteurelice, ca şi cele impotriva agalaxiei contagioase şi a unor boli respiratorii (PI-3) etc. Pentru astfel de produse, urmărirea judicioasă a rezultatelor obţinute în teren poate oferi criterii pentru aprecierea corectă a eficacităţii şi utilităţii lor.

Scanned with OKEN Scanner

Controlul imunogenității vaccinurilor poate fi făcut și indirect, pe baza anticorpogenezei postvaccinale, cu mențiunea că anticorpii serici induși de vaccin nu reprezintă constant expresia unei imunități corespunzătoare. Stabilirea unor corelații bazate pe metode biostatice și exprimate prin raporturi cantitative între gradul protecției și titrurile anticorpilor serici postvaccinali, oferă posibilitatea aprecierii imunogenității vaccinurilor prin examene serologice. Astfel de procedee s-au dovedit eficiente în evaluarea imunității antitoxice și pentru testarea unor vaccinuri virale. Controlul imunogenității prin examene serologice este inoperant la vaccinurile la care imunitatea este mediată celular.

În controlul calității vaccinurilor sînt aplicate și metode cantitative, care permit stabilirea cantității de antigen imunogen conținut în doza vaccinală. Ele se bazează fie pe inocularea vaccinului în doze fracționate, la loturi de animale sensibile și stabilirea dozei minime imunizante prin infecții de control sau a dozei imunizante 50 (DI_{50}) prin calculul statistic (metoda probit), fie pe stabilirea eficacității și exprimarea valorii produsului de control, comparativ cu un vaccin standard cu eficacitate cunoscută.

În cazul în care rezultatele controalelor atestă că produsul corespunde prevederilor din protocol, Laboratorul de Control avizează utilizarea lui în practică.

XIII. 3.7. Aplicarea vaccinurilor

Aplicarea vaccinurilor trebuie făcută cu respectarea strictă a prescripțiilor biofabricii în ceea ce privește condițiile de vaccinare, dozele utilizate și căile de inoculare, specificate în instrucțiunile de folosire a fiecărui vaccin.

Căi de administrare. Vaccinurile se administrează fie pe anumite căi parenterale (prin pielea scarificată, pe cale subcutanată, intramusculară sau intraperitoneală) fie pe căi naturale (conjunctivală, aerogenă, orală).

Vaccinările parenterale asigură atît certitudinea efectuării operațiunilor cît și administrarea unei doze prescrise de vaccin. Ele sînt însă laborioase pentru vaccinator și ajutoare presupunînd administrarea individuală a vaccinului, prinderea și contenția animalelor acționînd ca factor stressant.

Vaccinările parenterale devin greoaie sau chiar imposibil de aplicat în unitățile industriale, în special la păsări, numărul mare de animale făcînd intervențiile individuale inoperante. Pentru vaccinare se folosesc seringi de capacitate corespunzătoare dozelor de vaccin. Pentru ușurarea operațiunii au fost construite seringi semiautomate sau automate și chiar aparate electronice de inoculare.

Vaccinările pe căi naturale oferă avantajul administrării colective a vaccinului, ca vaccinare de masă, fiind preferate în unitățile cu densități mari de animale. Ele sînt eficiente în cazul unor vaccinuri vii atenuate, putînd induce o imunitate locală, deosebit de utilă pentru căile care servesc obișnuit ca porți de intrare pentru agenții patogeni ai bolilor pentru care se face vaccinarea.

Vaccinările pe căi naturale necesită un consum mai mare de vaccin, atît din cauza pierderilor survenite prin specificul operațiunilor de vaccinare cît și din necesitatea supradozării pentru a oferi șanse majorității indivizilor de vaccinat să „prizeze" o cantitate imunizantă din produs.

Metodele de vaccinare sînt arătate mai departe.

Vaccinarea prin scarificare constă în badijonarea unor scarificări cutanate cu tampoane îmbibate în vaccin. Se folosește în variolele aviare, badijonîndu-se cu vaccin pielea de pe fața an-

Scanned with OKEN Scanner

teroexternă a gambei, în prealabil deplumată şi eventual scarificată.

Un precedeu apropiat de vaccinare denumit *per cutan* aplicat cu un aparat (Hipospray-jet-injektor) are la bază penetrarea transcutanată a vaccinului prin presiune prin pielea normală.

Vaccinarea subcutanată se face cu seringi cu ace scurte şi cu lumen gros pentru a asigura administrarea strict subcutanată a vaccinului, evitînd inoculările sub fascii. Ca loc de elecţie se recomandă laturile gîtului la animalele mari (la taurine şi regiunea salbei), zonele posterioare ale spetei cu piele glabră şi fără lînă sau faţa internă a coapsei la ovine, zona gîtului posterioară urechii la porcine, părţile laterale ale abdomenului la carnivore şi partea superioară a gîtului la păsări.

Vaccinarea subcutanată este preferată pentru vaccinurile hidroxidate ca şi pentru vaccinurile vii, remanenţa lor la locul de inoculare prelungind acţiunea stimulului antigenic.

Vaccinarea intramusculară se face cu seringi cu ace lungi, în muşchii fesieri sau muşchii laterali ai gîtului la mamifere şi în muşchii aripilor sau pectorali la păsări. După administrarea intramusculară vaccinurile se resorb rapid, scurtînd durata stimulului vaccinal, metoda fiind recomandată pentru vaccinurile cu adjuvanţi uleioşi şi unele vaccinuri vii. Vaccinurile care dau reacţii la locul de inoculare (mai ales cele hidroxidate) depreciează calitatea cărnii.

Vaccinarea intraperitoneală se aplică cu ace cu bizoul scurt, impunînd respectarea strictă a regulilor de asepsie. Este recomandată doar la purcei pentru administrarea unor vaccinuri împotriva enteritelor, locul de elecţie fiind treimea posterioară ventrală a abdomenului şi lateral de linia albă.

Vaccinarea conjunctivală se aplică în unele boli la păsări şi constă în instilarea vaccinului în sacul conjunctival. Recomandarea ei este limitată de necesitatea vaccinării individuale.

Vaccinarea prin aerosoli este un procedeu de vaccinare modern, adecvat sistemului de creştere intensivă a animalelor, oferind largi perspective în viitor de adaptare pentru vaccinările de masă la toate speciile de animale.

Vaccinarea aerogenă este în unele boli superioară ca eficienţă vaccinărilor parenterale sau pe alte căi (E i d s o n şi col., 1976). Aparatul respirator are un sistem imun parţial independent de răspunsul prin anticorpi circulanţi şi în baza căruia este indusă o imunitate locală exprimată prin creşterea marcantă a nodulilor limfoizi din submucoasă, creşterea imunoglobulinelor în vasele bronhice şi prezenţa unor substanţe neutralizante în mucusul traheal (B e a r d şi E a s t e r d a y, 1967), reprezentată de creşterea IgA şi IgG (E v e r t, 1977). Vaccinarea aerogenă conferă o rezistenţă mai ridicată decît celelalte metode de vaccinare în infecţiile pentru care contaminarea spontană se face pe cale respiratorie (D o d o v s k i şi col. 1976; K l e n e n şi col., 1976; F e t c u şi col., 1977). În mucoasă, receptorii pentru stimulii externi şi celulele imunocompetente sînt foarte bine reprezentate şi specializate, după două zile de la aerosolizare observîndu-se stimularea celulelor anticorpoformatoare din limfganglionii regionali şi din splină (E g o r o v a şi col., 1974).

Vaccinarea prin aerosoli constă în transformarea suspensiei virale în particule fine cu dimensiunile între 20—60 microni (M a n l e m a n s şi col., 1975) pentru a asigura inhalarea şi penetrarea lor optimă în căile respiratorii. Pot fi utilizaţi şi aerosoli solizi obţinuţi prin pulverizarea vaccinurilor liofilizate (L e b e d i n s k i j, 1971).

Eficacitatea vaccinării aerogene este condiţionată de concentraţia virionilor în particule, gradul lor de dispersare şi doza inhalată, temperatura, umiditatea şi viteza aerului în adăpost şi unele particularităţi individuale (tipul de respiraţie şi viteza ventilaţiei pulmonare). Factorul hotărîtor în capacitatea

Scanned with OKEN Scanner

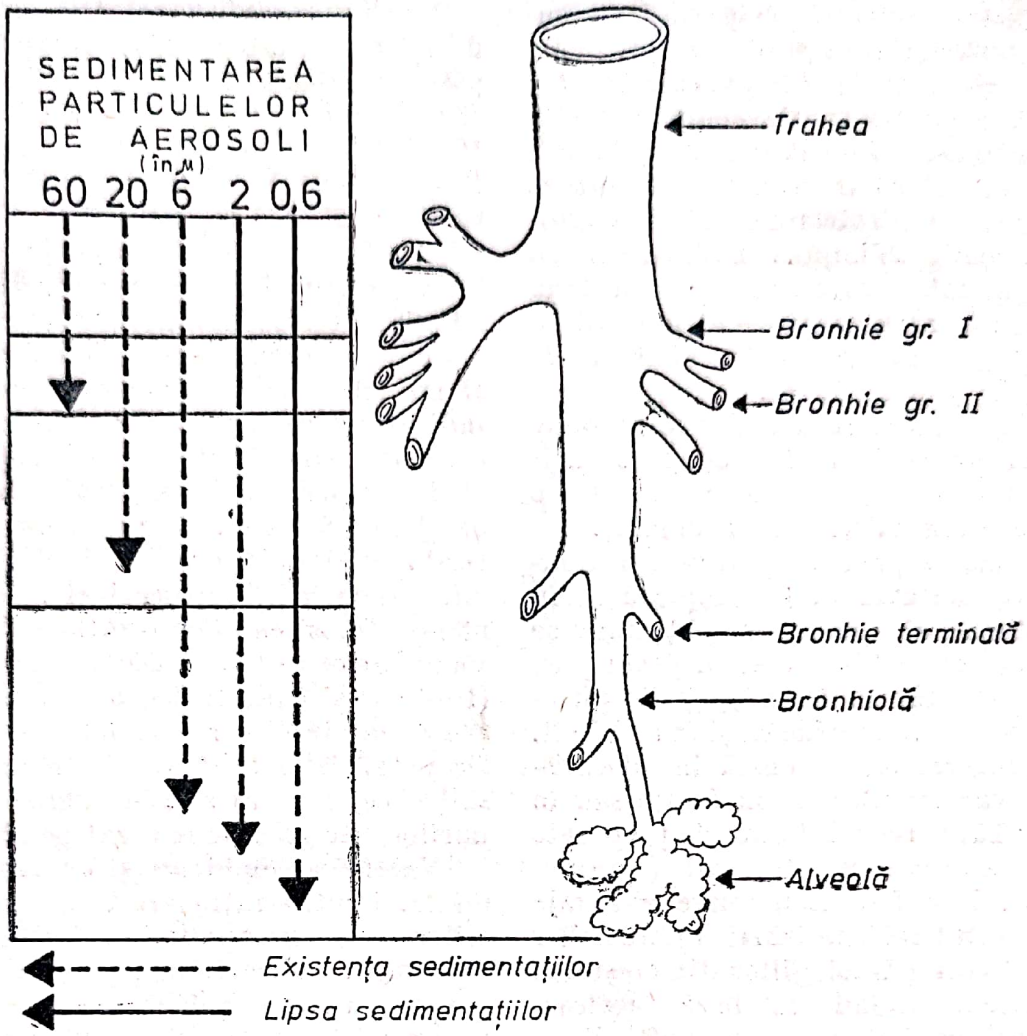


Fig. 53 — Cinetica pătrunderii și fixării aerosolilor în pulmon

de fixare și stimulare imună a particulelor îl constituie mărimea lor și adîncimea de pătrundere în segmentele aparatului respirator (G r a n n k e, 1975). Astfel, particulele supradimensionate nu penetrează suficient și duc la o imunizare slabă (S i n n e k e r, 1971), în timp ce particulele prea fine pătrund profund la nivelul bronhiilor și alveolelor unde virusul vaccinal se poate multiplica și activa germeni epifiți, generînd reacții post-vaccinale (V i l l e g a s și col., 1976). În fig. 53 este redată cinetica pătrunderii și fixării aerosolilor în pulmon în funcție de dimensiunile particulelor (după F e d j a e v și col., 1974). Diluantul în care se suspendă vaccinul pentru obținerea aerosolilor poate influența persistența lor activă (C o u g h și col., 1973), apa distilată fiind superioară din acest punct de vedere (Y a d i n și col., 1978). Apa cu 2% lapte mărește eficacitatea suspensiilor din care se obțin aerosolii (V i l l e g a s, 1976).

Pentru obținerea aerosolilor se folosesc aparate construite special sau adaptate și care au la bază trei principii de funcționare:

— dispersarea suspensiei virale prin pulverizare sub jet de aer sub presiune;

— principiul discurilor rotative în care suspensia vaccinală este dirijată între două discuri care se rotesc în sens invers cu viteză mare;

— pulverizarea suspensiei prin trecerea ei sub presiune prin duze, presiu-

nea de 8 atmosfere asigurînd dimensiuni convenabile ale aerosolilor.

La noi în țară pentru vaccinarea aerogenă a păsărilor din complexele industriale s-au folosit pompe „Mesta", aparatul „Turbair Sacci" din import ca și pompe „Protector 300" și electrocompresorul „Timpuri noi" dotat cu un recipient la care se adaptează două pistoale pentru vopsit, ultimul dînd cele mai bune rezultate (E l e f t e r e s c u și col., 1978).

În vaccinarea cu aerosoli se impune oprirea ventilației în adăpost atît în timpul operațiunii cît și cel puțin o oră după administrarea vaccinului.

Vaccinarea prin aerosoli și-a demonstrat eficacitatea în pseudopestă și în alte viroze ale păsărilor, obținîndu-se rezultate promițătoare și în pesta porcină, rujet, antrax, holeră, jigodie, pneumonii virale la taurine ca și în alte boli.

Imunizarea orală constă în administrarea vaccinurilor fie în furaje sau în apa de băut, fie sub formă de preparate corespunzătoare acestei căi (capsule, boluri). Ea oferă numeroase avantaje sub raportul raționalizării imunizărilor în condițiile tehnologiilor din creșterea industrială, avînd la bază aceleași principii de inducere a imunității ca și vaccinarea aerogenă. Unele limite se corelează cu particularitățile metabolice ale tubului digestiv. Astfel, pentru o imunizare satisfăcătoare sînt necesare cantități de vaccin de 100 de ori mai mari față de cele administrate parenteral (V o r o b j o v, 1973), pentru că numai 1% din antigen intervine ca stimul imunizant. Restul de 99% este degradat de acțiunea mecanică sau chimică a mediului gastrointestinal ca și de barierele imunologice, digestia gastrică și intestinală, modificînd structura antigenelor (acțiunea cea mai destructivă o are activitatea sucului gastric).

Antigenele vaccinale își exercită activitatea la nivelul mucoasei bucofaringiene și intestinale, inducînd un răspuns imun local și stimulînd anticorpogeneza în restul organismului.

Pînă în prezent, vaccinarea orală și-a dovedit utilitatea în vaccinarea antipseudopestoasă la păsări (S u h a c i și col., 1968; S t o e n e s c u și col., 1971—1972; E l e f t e r e s c u și col. 1968—1974 etc.) cu unele indicații particulare în ceea ce privește calitățile apei, folosirea unor substanțe protectoare pentru virusul vaccinal, dirijarea adăpării etc. La mamifere, folosirea căii orale de vaccinare este încă nerezolvată și nu este recomandată ca metodă cu indicație majoră pentru vaccinurile oficializate. Unele rezultate promițătoare obținute prin vaccinări orale anticolibacilare (S c h i m m e l, 1974) și antisalmonelice (M e y e r, 1975) la porcine, îi mențin perspectivele. De asemenea, folosirea ei cu rezultate bune în imunizarea antipestoasă a mistreților (P o p a și col., 1979), o impune pentru adoptare și o recomandă spre verificare și în alte boli ale animalelor sălbatice, la care administrarea vaccinurilor este greu de realizat pe alte căi.

Vaccinări combinate și cu vaccinuri mixte. Pentru raționalizarea intervențiilor cu biopreparate s-a stabilit posibilitatea aplicării în același timp, în puncte separate, a două sau mai multe vaccinuri (*vaccinare simultană sau combinată*). De asemenea, au fost elaborate *vaccinuri mixte sau asociate* care să se administreze sub formă de inoculare unică, amestecul antigenelor vaccinale făcîndu-se fie de biofabrică, în timpul preparării, fie extemporaneu, în momentul aplicării.

Contrar principiilor vechi, după care combinarea mai multor vaccinuri ar determina concurență antigenică și deci răspuns imun la unul din antigene, astăzi este demonstrată capacitatea organismului mamiferelor și păsărilor de a se imuniza concomitent față de un număr mare de antigene (20 de antigene și poate și mai mult) (H o r s c h, 1977).

Eficiența imunogenă a vaccinurilor mixte sau administrate simultan depinde de tipul de vaccinuri, calitățile antigenice și adjuvanții pe care ele

Scanned with OKEN Scanner

îi conţin. Fiecare combinaţie trebuie să fie testată experimental înainte de a se recomanda folosirea ei în practică. În principiu, nu se pot asocia vaccinuri vii cu vaccinuri inactivate în cazul în care inactivantul poate avea efect nociv asupra celui viu.

Eficienţa vaccinării concomitente sau cu vaccinuri mixte a fost verificată şi atestată în numeroase boli. Astfel, la porci se pretează aplicarea vaccinării concomitente sau cu vaccinuri mixte în pestă şi rujet (Gavrilov şi col., 1971; Popa şi col., 1976), în pestă, rujet şi boala lui Aujeszky (Conopatkin, 1972.; Byirkan şi col., 1972; Kasanov, 1976; Nedelciu şi col., 1977). La păsări, se pot practica vaccinări mixte antipestoase şi antibronşitice (Bough, 1977), antipestoase şi antivariolice (Suhaci şi col., 1958, 1966; Ballo şi col., 1976), contra pseudopestei, laringotraheitei şi variolei (Bolmosov şi col., 1978), şi împotriva pseudopestei şi holerei (Golubnichi şi col., 1975—1976).

La ovine, vaccinarea mixtă a fost încercată în antrax, bruceloză şi listerioză (Garinkovo, 1978).

La canide, se aplică în mod curent vaccinarea antijigodioasă, antihepatitică şi antileptospirică cu vaccinuri mixte special preparate în acest scop.

Vaccinarea cu vaccinuri mixte apare utilă în cazul asocierii a două sau mai multe vaccinuri care sînt recomandate să se aplice generalizat, sau sînt incluse în tehnologiile sanitare veterinare din unităţi industriale. Vaccinările combinate sînt cele mai larg folosite, ele permiţînd o adaptare a intervenţiilor, corespunzătoare fiecărei conjuncturi sau situaţii epizootologice în parte.

XIII. 3.8. Eficienţa măsurilor de imunoprofilaxie şi planificarea lor

Importanţa imunoprofilaxiei în combaterea bolilor la animale este incontestabilă, fapt verificat şi atestat de practica largă a luptei antiepizootice dusă de-a lungul ultimului secol. Marile flagele ale creşterii animalelor, ca febra aftoasă, pesta porcină, pseudopesta, antraxul, turbarea şi multe altele cu care s-a confruntat în trecut omenirea şi-au modificat profund gravitatea, putînd fi astăzi stăpînite datorită în principal folosirii unor vaccinuri eficace.

Realizările şi succesele imunoprofilaxiei oricît ar îndemna la optimism, nu trebuie să ducă la exagerări care să estompeze limitele pe care utilizarea biopreparatelor le are. Astfel de exagerări dublate de minimalizarea pînă la neglijare a celorlalte măsuri de luptă antiepizootică ar fi deosebit de dăunătoare, întîrziind sau făcînd chiar imposibilă realizarea dezideratului final pe care profilaxia trebuie să îl vizeze şi care trebuie să fie eradicarea bolilor.

Aspectele principale de care sînt legate limitele imunoprofilaxiei ar putea fi conturate astfel:

— nici un preparat biologic folosit în imunoprofilaxie nu conferă o protecţie absolută la toate animalele la care se utilizează, datorită unor stări de areactivitate imunologică, ruperi de imunitate etc.;

— chiar în condiţiile unor produse de mare valoare imunogenă, aplicate în modul cel mai raţional şi corect posibil, nu poate fi asigurată protecţia tuturor indivizilor receptivi, existenţi la un moment dat. Animalele rămase descoperite imunologic (animalele tinere încă nevaccinate, animalele sălbatice receptive etc.) pot face boala şi să întreţină pericolul potenţial de infecţie;

— efectul imunoprofilaxiei este limitat în timp, durata imunităţii postvaccinale fiind de multe ori mai scurtă decît menţinerea surselor potenţiale de infecţie. Exemple concludente în acest

Scanned with OKEN Scanner

sens îl oferă infecţiile telurice produse de bacteriile sporulate;

— variabilitatea microorganismelor şi pluralitatea lor antigenică fac ca un produs biologic deosebit de activ într-o epizootie, să fie ineficace în alte episoade (febra aftoasă, botulism, Blue-tongue, colibaciloze etc.);

— existenţa unui număr mare de boli în care produsele imunoprofilactice au o valoare destul de relativă (unele viroze respiratorii, holera aviară, salmonelozele etc.).

Toate aceste limite impun ca în aprecierea generală, imunoprofilaxia să fie integrată şi subordonată profilaxiei globale, neputîndu-se substitui celorlalte măsuri sau să facă posibilă neglijarea lor. Acest principiu de orientare generală conduce la necesitatea de a evalua şi stabili rolul şi locul pe care imunoprofilaxia trebuie să îl aibă în ansamblul luptei antiepizootice, în funcţie de particularităţile pe care le prezintă fiecare boală în parte. Cu alte cuvinte, posibilităţile de care omul dispune de a identifica şi distruge sau anihila sursele de infecţie, de a cunoaşte şi întrerupe circuitele infecţioase şi de a modifica receptivitatea animalelor prin vaccinuri, constituie contextul în care imunoprofilaxia poate fi evaluată realist atît ca eficienţă de moment într-o conjunctură epizootologică dată, cît şi în perspectiva limitării şi eradicării unei boli.

Evaluarea realistă a utilizării şi eficienţei biopreparatelor, pentru a se realiza obiectivele urmărite în fiecare boală, constituie baza elaborării unor programe de eradicare şi a planurilor de acţiuni imunoprofilactice.

Scanned with OKEN Scanner

Bibliografie selectivă*

1. Aitken, I. D., Parry, S. H. — Immunology 31, 1976, 33
2. Aitken, M. M., Sanford, J. — J. Comp. Path. 82, 1972, 247
3. Akerlund, A. S., Hanson, L. A. și col. — Scand. J. Immunol. 6, 1977, 1275
4. Alhaji, I., Johnson, D. W. și col. — Amer. J. vet. Res. 35, 1974, 725
5. Allen, W. D., Porter, P. — Clin. exp. Immun. 21, 1975, 407
6. Allen, W. D., Porter, P. — Immunology 32, 1977, 819
7. Andersen, A. E. — Acta vet. scand. 16, 1975, 251
8. Andries, K., Pensaert, M. B. și col. — Amer. J. vet. Res. 39, 1978, 1282
9. Appella, E., Chersi, A. și col. (în): Developmental aspects of antibody formation and structure, 1970, 327
10. Arnon, R. (în) — The Antigens, I, 1973, 87
11. Arnon, R. (în) Progress in Immunology II, Biological Aspects I, 1974, 5
12. Atanasiu, P., Savy, V. și col. — Ann. Microbiol. 128 A, 1977, 189
13. Atassi, M. A. — Immunochemistry 12, 1975, 423
14. Austen, F. — J. Immunol. 121, 1978, 793
15. Avram, N. și col. — Rev. creșt. anim. 3, 1978, 36
16. Barta, O., Hubbert, N. L. — Amer. J. vet. Res. 39, 1978, 1303
17. Bem, St., Popescu, A. — Lucr. științ. I.C.V.B. Pasteur 10, 1973, 13
18. Bemrick, W. J., O'Leary, T. P. și col. — Immunology 32, 1977, 567
19. Bennich, H., von Bahr-Lindström, H. — Progress in Immunology II, Biol. Aspects I, 1974, 29
20. Benten, C. von, Floer, W. și col. — Zbl. Bakt. 23 B, 1976, 200
21. Bergman, R., Moreno-Lopez, J. și col. — Res. vet. Sci. 25, 1978, 193
22. Bârnaure, Gh. și col. — Rev. creșt. anim. 2, 1976, 79
23. Bârnaure, Gh. și col. — Rev. creșt. anim. 9, 1978, 55
24. Boitor, I., Popa, M. și col. Simpozion Cluj-Napoca, 1976, 169
25. Bradburry, J. M., Oriel, C. A., și col. — J. clin. Microbiol. 3, 1976, 449
26. Brar, J. S., Johnson, D. W. și col. — Amer. J. vet. Res. 39, 1978, 241
27. Brown, P. J., Bourne, F. J. — Amer. J. vet. Res. 37, 1976, 9
28. Bruggman, S., Keller, H. și col. — Vet. Rec. 101, 1977, 109
29. Buening, G. M., Perryman, L.E. și col. — Inf. Immun. 19, 1978, 695
30. Buergelt, C. D., Delisle, G. și col. — Amer. J. vet. Res. 39, 1978, 591
31. Buergelt, C. D., Hall, C. E. și col. — Amer. J. vet. Res. 38, 1977, 1709

*Bibliografia completă la autori

75. Gallin, J. J., Sander, J. A. şi col. — J. Immunol. 120, 2, 1978, 492
76. Gheorghiu, I., Stanca, M., şi col. — Lucr. şt. ICVB Pasteur 9, 1971—1972, 69
77. Ghergariu, S. şi col. — Rev. creşt. anim. 3, 1979, 52
78. Ghergariu, S., Baba, I. — Rev. creşt. Anim. 1, 1977, 38
79. Gheţie, V. (în) Imunologie, imunochimie, imunopatologie, Ed. Acad. R.S.R. 1975, 91
80. Gheţie, V., — Semnale şi receptori în imunologie, Buc. Ed. ştiinţifică şi enciclopedică 1977, 147
81. Gheţie, V., Mihăescu, S. — Immunochemistry, 10, 1973, 251
82. Gheţie, V., Motaş, C. — Immunochemistry, 8, 1971
83. Goodman, J. W. (în) — The Antigens III, 1975, 127
84. Goudswaard, J., Vaerman, J. P. şi col. — Int. Arch. Allergy appl. Immunol., 53, 1977, 509
85. Goudswaard, J. Vander Donk, J. A. şi col. — Scand. J. Immunol. 8, 1978, 21
86. Granciu, I., Cureu, I. — Lucr. şt. I. C. Zoot. 27, 1969, 15
87. Granciu, I., Cureu, I. — Lucr. şt. I. C. Zoot. 27, 1969, 22
88. Granciu, I., Duică, S. şi col. — Grupele sanguine la animale domestice, 1973
89. Grădinaru, D. şi col. — Rev. creşt. anim. 11, 1977, 30
90. Hakomori, S., Kobata, A. (în) The Antigens II, 1974, 80
91. Hallissay, R. — Res. vet. Sci, 24, 1978, 264
92. Halpern, M. S., Koshland, M. E. — Nature, 228, 1970, 1276
93. Hamuro, J., Hadding, U. şi col. — J. Immunol. 120, 2, 1978, 438
94. Hannoun, C., Microbiologie générale — 2 les virus. Paris Ediscience Mc Graw Hill, 1976, 361 p.
95. Heilman, P., Steinbach, G. — Arch. exp. Vet. Med. 32, 1978
96. Heremans, J. F. (în) — The antigens II, 1974, 365
97. Hoerlein, A. B., Jones, D. L. — J. Amer. vet. Med. Assoc. 1970, 1977, 325
98. Horsch, F. — Immunoprophylaxe bei Nutztieren — VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1977
99. Hurvell, B. — Nordisk Vet. Med. 30, 1978, 305
100. Husband, A. J., Watson, D. L. — Vet. Bull. 48, 1978, 911
101. Ignatovic, J., Rübsamen, H. şi col. — J. Immunol. 1978, 12, 5, 1663
102. Ionică, C. şi col. — Rev. creşt. anim. 12, 1975, 40
103. Iordache, Al., Ungureanu, C. — Arch. vet. 11—12, 1976, 85
104. Ishizaka, K. (în) The Antigens I, 1973, 479
105. Ishizaka, K., Itani, S. col. — J. Immunol. 120, 1, 1978, 65
106. Jivoin, P., Cîrsteţ, I. şi col. Lucr. I.C.V.B. Pasteur 13, 1977, 141
107. Kaaden, O. R., Frenzel, B. şi col. — Virology 77, 1977, 501
108. Kondi, V., Mitrică, N. şi col. — Produse farmaceutice româneşti, derivate de sînge, folosite în terapeutică, Ed. Med. Buc. 1973
109. Kubo, R. T., Zimmerman, B. şi col. (în) The Antigens I, 1973, 417
110. Labadie, J. P., Toma, B. — Rec. Méd. Vét. 155. 1979, 47
111. Lagrange, P. H. — Ann. Microbiol. 129 A, 1978, 97
112. Lederer, E. — Ann. Microbiol. 129 A, 1978, 91
113. Lee, G. C., Ladds, P. W. şi col. Res. Vet. Sci. 24, 1978, 322
114. Lee Lucy, Sharme, J. M., şi col. — J. Immunol. 120, 5, 1978, 1554
115. Lind, A. — Int. Arch. Allergy 17, 1960, 300
116. Logan, E. F., McMurray C. H. şi col. — Brit. vet. J. 134, 1978, 258
117. Lustermann, H., Günther, H. — Arch. exp. Vet. Med. 31, 1977, 53
118. Manolescu, N., şi col. Rev. creşt-anim. 7, 1976, 66

Scanned with OKEN Scanner

119. Manolescu, N., şi col. Rev. creşt. anim. 11, 1976, 41
120. Manolescu, N., Begnescu, R. şi col. — Lucr. şt. ICVB Pasteur 9, 1971—1972, 45
121. Manolescu, N., Bîrză, H. şi col. — Ghid de hematologie a animalelor în creşterea intensivă Buc. Ed. Ceres, 1978, 9, 33
122. Manolescu, N., Popa, M. şi col. — Archiva vet. 11—12, 1976, 9
123. Marcelleti, J., Furmanski, P. — J. Immunol. 120, 1, 1978, 1
124. Marinescu, M. — Sindromul de deficit imunologic la viţei şi combaterea lui, Ed. Ceres, 1975
125. Martinsson, K., Jönsson, L. — Zbl. Vet. Med. A, 22, 1975, 276
126. May, I., Donţa, C., şi col. Simpozion Cluj-Napoca 1976, 124
127. May, I., Mănoiu, I. şi col. — Arch. Exp. Vet. Med. 33, 1979, 87
128. Mayer, E. P., von — Yuan Chen şi col. — J. Immunol. 120, 1, 1978, 173
129. Mesrobeanu, I., Berceanu, St. (în) Imunobiologie, imunochimie şi imunopatologie. Edit. Acad. R.S.R., 1975, 155
130. Mesrobeanu, L., Păunescu, E. (în) Imunobiologie, imunochimie, imunopatologie, 1975, 59
131. Mesrobeanu, I., Păunescu, E. (în) Imunobiologie, imunochimie, imunopatologie. Edit. Acad. R.S.R., 1975, 114
132. Mesrobeanu, I., Păunescu, E. (în) Imunobiologie, imunochimie şi imunopatologie. Edit. Acad. R.S.R., 1975, 131
134. Milon, A., Geral, M. F., — Rev. Méd. Vét. 129, 1978, 983
135. Mizel, S. B., Oppenheim, J. J. şi col. — J. Immunol. 120, 1978, 1497
136. Morein, B. — Zeitschr. Imm. Forsch. 144, 1972, 63
137. Mukkur, T. K. S. — Amer. J. vet. Res. 39, 1978, 1269
138. Munţiu, N., Dohotaru, V. şi col. — Arch. Vet. 9, 1972, 21
139. Muscoplat, C. C., Thoen, C. O. şi col. — J. Amer. vet. Res. 36, 1975, 395
140. Nakamura, Y., Costa, J. şi col. — J. Immunol. 121, 3, 1978, 1130
141. Nedelciu, D., Suhaci, I. şi col. — Rev. creşt. anim. 8, 1977, 43
142. Nedelciu, D., Suhaci, I., Vior, C. şi col. — Lucr. ICVB Pasteur, 13, 1977, 29
143. North, R. J. — J. Immunol. 121, 3, 1978, 806
144. Olinescu, A. — Ontogenia imunoglobulinelor la şoarecele alb de laborator. Teză de doctorat FMV Bucureşti 1975, 105
145. Oyeniyi, O. O., Hunter, A. G. — J. Dairy Sci, 61, 1978, 44
146. Pahud, J. J., Mach, J. P. — Immunochemistry 7, 1970, 679
147. Pasternak, Y. R., Johnson, R. J. şi col. — J. Immunol. 5, 1978, 1567
148. Paştea, Z. — Arch. vet. 11—12, 1976, 135
149. Păltineanu, D. şi col. — Rev. creşt. anim. 1, 1975, 76
150. Păltineanu, D. şi col. — Rev. creşt. anim. 1978, 1, 29
151. Pătraşcu, I. V. — Rev. creşt. anim. 6, 1978, 51
152. Păunescu, E. — Ftiziologia 16, 1967, 481
153. Păunescu, E. — Ftiziologia 21, 1972, 449
154. Păunescu, E. (în) Imunobiologie, imunochimie, imunopatologie, 1975, 123
155. Păunescu, E. (în) Imunobiologie, imunochimie şi imunopatologie 1975, 155
156. Păunescu, Gh., Manolescu, N., şi col. — Lucr. ICVB Pasteur 14, 1978, 65
157. Păunescu, Gh., Stoenescu, V. şi col. — Archiva Vet. 11—12, 1976, 113
158. Pepys, M. S., Dash, A. C. şi col. — Nature, 273, 1978, 168
159. Piguet, P. F., Vassalli, P. — J. Immunol. 120, 1, 1978, 79
160. Pîrvu, Gh. şi col. — Rev. creşt. anim. 3, 1979, 52
161. Pîrvulescu, M., Grigore, C. şi col. — Lucr. ICVB Pasteur 13, 1977, 149

Bun de tipar: 20.05.1980. Apărut 1980.
Coli editoriale: 23,48. Coli de tipar: 15,50.
Planșe: 12.

Întreprinderea poligrafică Sibiu
Șos. Albă Iulia nr. 40
REPUBLICA SOCIALISTĂ ROMÂNIA
Comanda nr. 30

Scanned with OKEN Scanner